ÉTUDES BIOLOGIQUES ET CHIMIQUES DES TRITERPÈNES D'EUPHORBIACÉES

PAR

GÉRARD PONSINET

STRASBOURG 1967

N° d'ordre:

THÈSES

PRÉSENTÉES

À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR -ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

GÉRARD PONSINET

INGÉNIEUR ENSCS
ASSISTANT A LA FACULTÉ DES SCIENCES

PREMIÈRE THÈSE

ÉTUDES BIOLOGIQUES ET CHIMIQUES DES TRITERPÈNES D'EUPHORBIACÉES

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 16 Décembre 1967 devant la Commission d'examen

MM. G. OURISSON — Président
J. F. BIELLMANN
H. DURANTON
R. SCHNELL

Imprimé Berenz
Représentant: M. Kiefer – Nouvelle Cité 17 – 67 Lingolsheim

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE STRASBOURG

FACULTE DES SCIENCES

Doyen : Professeur J.H. VIVIEN

Doyens Honoraires : A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE, G. MILLOT.

Professeurs Honoraires : P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN, G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, H. GAULT, Mle S. GILLET, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P.L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, Ch.SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.

Maître de Conférences Honoraire : R. WEIL.

Professeurs :

H.J. MARESQUELLE.....	T.	Biologie végétale
A.ROUSSEL.....	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER.....	T.	Chimie générale
J. ROTHE.....T.		Physique du Globe
P. LACROUTE.....T.		Astronomie
J.H. VIVIEN.....	T.	Zoologie et Embryologie experimentale
A. MAILLARD.....	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY.....	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN.....	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE.....	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD.....	T.	Chimie Organique
Mle M. PEREY.....	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB.....	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY.....	T.	Biologie générale
H. BENOIT.....	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER.....	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT.....	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET.....	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER.....	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER.....	T.	Chimie minérale
Mle A. GAGNIEU.....	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE.....	T.	Physique générale
F. STUTINSKY.....	T.	Physiologie générale
B. WURTZ.....	T.T.P.	Chimie biologique
J. BRENET.....	T.	Electrochimie
G. OURISSON.....	T.T.P.	Chimie
Cl. LEVI.....	T.T.P.	Biologie générale
A. COCHE.....	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF.....	T.	Physique générale
J. FRENKEL.....	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG.....	T.	Physique
J.P. LONCHAMP.....	T.T.P.	Physique
A. DELUZARCHE.....	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET.....	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER.....	T.T.P.	Physique
A. ROCHE.....	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH.....	T.	Microbiologie
A. SIGOT.....	P.S.C.	Zoologie

J. COGNE	T.T.P.	Géologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	T.T.P.	Physique
P. MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale
J.F. EBEL	T.	Chimie biologique
J. PARROD	T.T.P.	Chimie
R. WEY	T.T.P.	Chimie
Mme D. MAGNAC	T.T.P.	Physique
M. DAUNE	P.S.C.	Physique
J.P. ADLOFF	T.T.P.	Chimie nucléaire
D. BERNARD	T.T.P.	Méthodes mathématiques de la physique
M. ZISMAN	T.T.P.	Mathématiques
E. DANIEL	T.	Physique expérimentale
P. CHEVALLIER	P.S.C.	Physique
J. GREMILLARD	T.T.P.	Mathématiques
P. CARTIER	T.	Mathématiques M.P.C.
G. REEB	T.	Topologie
F. NORGUET	T.	Analyse supérieure
R. CHAUVIN	T.	Psychophysiologie
J. WUCHER	P.S.C.	Physique
Mme M. BRINI	P.S.C.	Chimie
G. PERNY	P.S.C.	Physique
R. BARO	P.S.C.	Physique
H. DURANTON	P.S.C.	Botanique
R. WEISS	T.T.P.	Chimie
P. FEDERLIN	T.T.P.	Chimie
J. LERAY	P.S.C.	Physique
J.P. SCHWING	P.S.C.	Chimie
M. SIESKIND	P.S.C.	Physique
G. MONSONEGO	P.S.C.	Physique mathématique
P. GABRIEL	T.T.P.	Mathématiques
C. WIPPLER	T.	Physicochimie des Hauts Polymères Industriels
P.A. MEYER	T.T.P.	Mathématiques
G. WEILL	P.S.C.	Physique
J.M. BLOCH	T.	Chimie
A. CLAUSS	P.S.C.	Chimie
R. OMNES	P.S.C.	Physique théorique
E. FOLLENIUS	P.S.C.	Zoologie
J. LUCAS	P.S.C.	Géologie

Professeurs associés :

S.R. DE GROOT	Physique nucléaire
K. VESELY	Physicochimie macromoléculaire

Maîtres de Conférences :

H. DANAN	Physique
Mme WINTER Chr.	Physique
J.P. EBERHART	Minéralogie
Mme D. CAGNIANT	Chimie
X. FERNIQUE	Mathématiques
J. STREITH	Chimie
J. WEIL	Chimie biologique
F. GAUTIER	Physique propédeutique
G. SUTTER	Physique électronique
D. FOATA	Mathématiques
J.L. VERDIER	Mathématiques
J.M. LEHN	Chimie
Cl. ROBERT	Physique

Maîtres de Conférences Associés :

V. AVANISSIAN	Mathématiques
R.A. MASSY-WESTROPP	Chimie Organique

Secrétaire : G. SAINT-PE.

A tous les miens

En témoignage de gratitude et d'affection

Monsieur le Professeur Ourisson

Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour la formation que vous m'avez donnée.

Je vous dois non seulement le sujet de ce travail, mais aussi les nombreux encouragements et conseils qui m'ont permis de le faire aboutir.

Je suis heureux d'avoir pu profiter pendant ces quatre années de l'ambiance de travail particulièrement favorable que vous maintenez dans votre laboratoire.

Je remercie tous ceux qui ont collaboré à ce travail ainsi que toutes les personnes qui ont manifesté un intérêt ou apporté des suggestions pour sa réalisation.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'étude de la biosynthèse des terpènes et stérols a fait depuis quelques années des progrès considérables, dus en particulier à l'amélioration des techniques chromatographiques.

Ceci a conduit à remettre en question un certain nombre de concepts généralement admis mais basés sur des expérimentations insuffisantes : cyclisation concertée du squalène en triterpènes et rôle du lanostérol comme précurseur universel des stérols par exemple.

Les nombreuses recherches entreprises sur la cyclisation du squalène ne se justifient pas uniquement dans le but d'avoir une meilleure connaissance de la biosynthèse des stérols. La connaissance exacte de ses caractéristiques électroniques, énergétiques et stériques doit permettre en effet d'avoir une idée plus juste du mode d'interaction substrat-enzyme quand le substrat n'est pas soluble dans l'eau.

Ce problème peut être abordé sur plusieurs plans :

- mécanisme électronique et chimique,
- exigences enzymatiques et cytologiques,
- variabilité et signification génétique,
- etc...

Le chapitre I rapporte l'essentiel des résultats acquis antérieurement sur la cyclisation du squalène.

Pour apporter notre contribution à ce problème général nous avons choisi comme matériel d'étude les triterpènes d'Euphorbiacées. De nombreux travaux chimiques antérieurs ont permis d'établir la structure de ces produits et de mettre ainsi en évidence leur grande diversité. Parmi ces produits, on trouve en particulier le lanostérol qui est le précurseur des stérols ani-

maux, et le cycloarténol, qui semble jouer le même rôle chez les végétaux supérieurs, et également de nombreux autres isomères du lanostérol, triterpènes tétra et pentacycliques, auxquels il est difficile d'attribuer un rôle chimique .

Pour notre part, nous nous sommes intéressés principalement à l'aspect biologique de ces produits.

Dans la première partie de cette thèse, nous indiquons l'intérêt du latex d'Euphorbe pour l'étude de la cyclisation du squalène :

- par la diversité des directions que prend cette réaction dans ce milieu, il est possible de montrer que la répartition des triterpènes n'est pas anarchique mais correspond à des données d'évolution fournies par la morphogénétique et la phytogéographie (Chapitres II, III et IV)

- le latex qui contient ces triterpènes peut être recueilli in vitro en fournissant un cytoplasme non dispersé qui peut permettre de déterminer les exigences cytologiques de la réaction et de montrer la particularité de la biosynthèse des triterpènes du latex par rapport à ceux des tissus végétaux (Chapitres V et VI).

Ces résultats posent le problème du rôle biologique que peuvent jouer ces triterpènes.

La deuxième partie consiste en des résultats chimiques annexes.

Dans le chapitre VIII nous mentionnons quelques remarques sur le mécanisme de l'époxydation des triterpènes, réaction largement utilisée dans les analyses de produits naturels de la première partie.

Nous rapportons ensuite des résultats relatifs à des transpositions ioniques de méthyles angulaires amorcées par la protonation de la double liaison 8,9 dans les séries de l'euphène (Chapitre VIII) et du lanostène (Chapitre IX), modèles in vitro de transpositions accompagnant la formation des triterpènes.

Les chapitres II, III, IV et V sont des reproductions intégrales d'articles parus dans Phytochemistry, les chapitres VI et VII les textes de publication sous presse à Phytochemistry et au Bulletin de la Société Chimique.

P R E M I È R E P A R T I E

C H A P I T R E I

LA CYCLISATION DU SQUALÈNE

Parmi les nombreux travaux réalisés sur la biosynthèse des terpènes et stérols (1) quelques uns ont permis d'expliquer partiellement le mécanisme de la cyclisation du squalène.

MÉCANISME RÉACTIONNEL

Le modèle théorique de cette réaction a été établi par l'école de Zürich (2) d'après les postulats suivants :

- c'est le squalène tout-trans qui se cyclise.
- chaque cyclisation provient d'une orientation spécifique en chaises et bateaux potentiels provoquée par une surface enzymatique.
- la cyclisation a lieu par une suite d'additions planaires trans sur des doubles liaisons. Les circonstances stéréoélectroniques favorisent les réarrangements de Wagner Meerwein ultérieurs.

Le Tableau 1 indique le mécanisme généralement admis pour expliquer la formation des quatre triterpènes dont il sera le plus question dans la suite de ce travail : lanostérol, cycloarténol, euphol et tirucallol.

EXPÉRIMENTATION

A côté de ces règles théoriques, un certain nombre de faits expérimentaux ont été acquis par l'utilisation de matériels biologiques d'origines variées :

(1) Pour cette importante bibliographie, les plus récentes revues sont celles de J.H. RICHARDS et J.B. HENDRICKSON, Biosynthesis of steroids, terpenes and acetogenins, Ed. Benjamin New York (1964) ; R.B. CLAYTON, Quat.Rev. 19, 168 (1965). On pourra s'y reporter pour les références non indiquées ici.

(2) A. ESCHENMOSER , L. RUZICKA, O.JEGER et D.ARIGONI, Helv.Chim.Acta., 38, 1890 (1955)

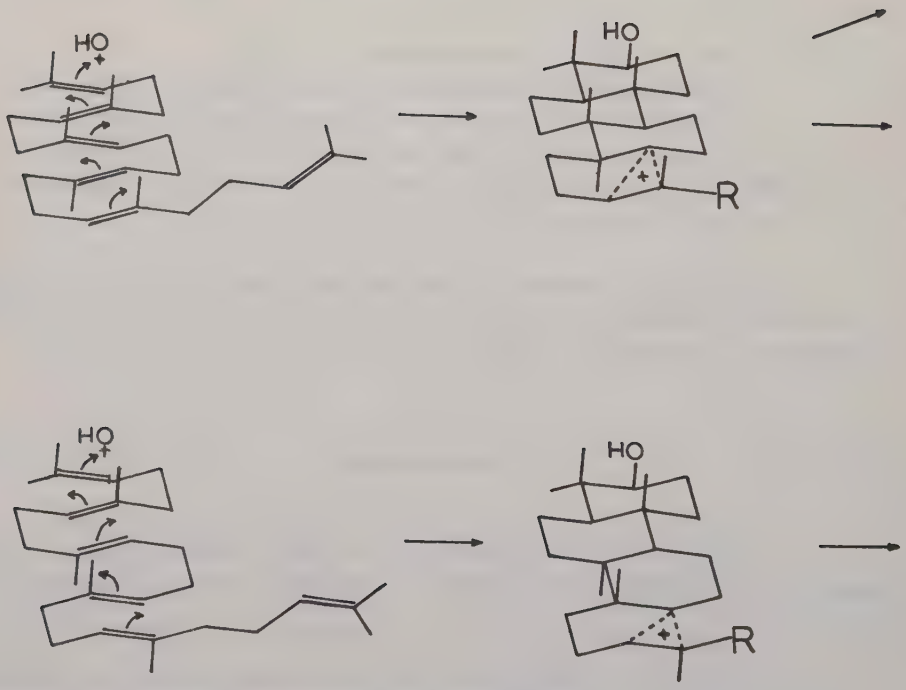
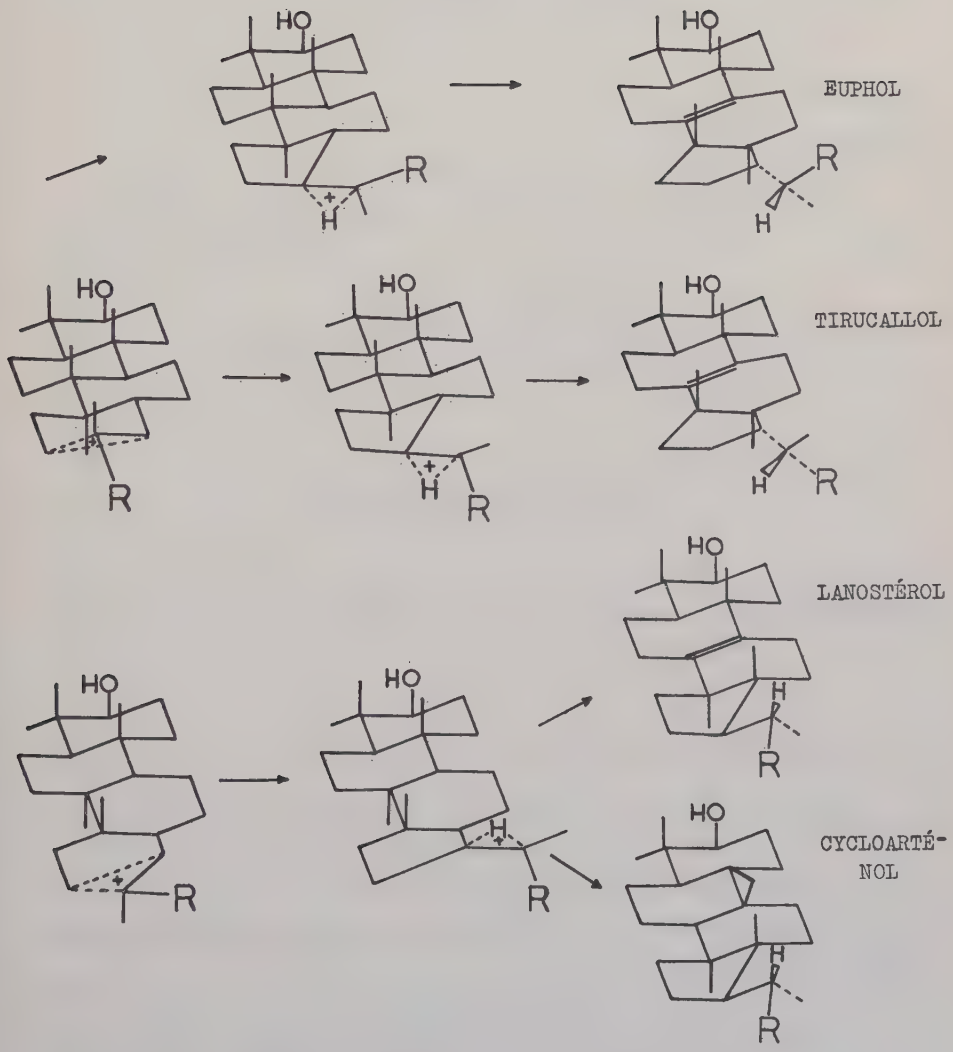


TABLEAU I


HO
R
H
EUPHOL
TIRUCALLOL
LANOSTÉROL
CYCLOARTÉ-
NOL

- animaux : - foies de rat et porc
  - testicules de rat
  - surrénales de boeuf
  - placenta humain

- végétaux : - levures
  - graines en germination
  - tissus cultivés in vitro

La préparatinn du squalène radio-actif utilisé pour l'étude de sa cyclisation a été faite par :

- voie chimique (réaction de Wittig) (3)
- biosynthèse par des organismes in vivo
  - rats (4)
  - levures (5)
  - pois en germination (6)
- biosynthèse par des systèmes enzymatiques in vitro
  - homogénats de foie de rat (7).

ACQUISITIONS EXPÉRIMENTALES

Nous ne détaillons pas les acquisitions réalisées par chacune de ces expérimentations. Globalement elles se résument ainsi :

---

(3) S. TRIPPETT, Chem. Ind., 80 (1956) ; D.W. DICKER et M.C. WHITING, CHem.Ind. 351 (1956) ; R.E. WOLFF et L. PICHAT, Compt.Rend., 246, 1868 (1958).

(4) P.B. SCHNEIDER, R.B. CLAYTON et K. BLOCH , J.Biol.Chem., 224 175 (1957)

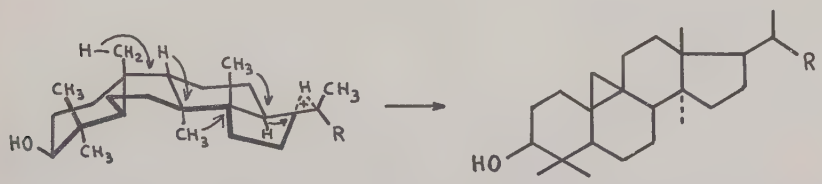
(5) E. SCHWENK, E.J. ALEXANDER, T.H. STOUDT et C.A.FISCH, Arch.Biophys.Bioch. 55, 274 (1954).

(6) E. CAPSTACK, Biochemistry 1, 1178 (1962).

(7) R.G. LANGDON et K. BLOCH, J.Biol.Chem., 200, 129 (1953).

1 - le squalène naturel est bien tout-trans et a pu effectivement être transformé en lanostérol, β-amyrine et stérols animaux et végétaux par différents organismes (8)

2 - les réarrangements de méthyles mentionnés dans le tableau 1 sont bien des migrations trans 1,2. Dans le cas du cycloarténol, Rees (9) a montré que contrairement à cette loi de migrations trans concertées, la formation du cyclopropane 9,10 β accompagne sur la même face β de la molécule la migration d'hydrure de 9β en 8β .



(8) La première de ces cyclisations enzymatiques a été décrite par T.T.TCHEN et K. BLOCH, J.Biol.Chem., 226, 920 (1957).

(9) H.H.REES travail non publié, cité par L.J.GOAD, dans Aspects of Phytosterols Biosynthesis, dans Terpenoids in Plants, Ed. J.B.Pridham, Academic Press, London 1967.

3 - le mécanisme concerté du tableau 1 avec attaque de "OH^+" a été revisé récemment par la mise en évidence d'intermédiaires (10):

- dans la levure il y aurait d'abord cyclisation en lanostadiène puis hydroxylation en lanostérol. Ce résultat est pour l'instant à considérer de façon critique car il n'a été décrit que très partiellement
- dans le foie de rat et dans plusieurs systèmes végétaux le squalène est d'abord époxydé en 3,4β * et par "attaque acide" de cet époxyde il y a cyclisation.

Les résultats actuels n'excluent d'ailleurs pas le rôle d'autres intermédiaires à renouvellement rapide comme par exemple des produits ayant seulement le cycle A formé (11).

Quelle que soit la voie utilisée la transformation du squalène en triterpènes 3β OH exige l'action spécifique d'enzymes ayant un double rôle :

- oxydation en 3β
- mise en conformation du squalène.

Oxydation en 3β

Qu'il s'agisse de l'époxydation d'un hydrocarbure acyclique ou de l'hydroxylation en 3β du lanostadiène, cette réaction s'explique par le rôle d'une oxydase qui catalyse l'absorption d'une molécule d'oxygène par molécule de substrat : un atome O apparaît dans la molécule oxydée et l'autre dans H_2O. La réaction est inhibée en anaérobie.

---

* numérotation de stéroïde

Dans les deux cas, le bilan de la réaction peut s'écrire :

$$C_{30}H_{50} + O_2 + 2H^+ + 2e \longrightarrow C_{30}H_{50}O + H_2O$$

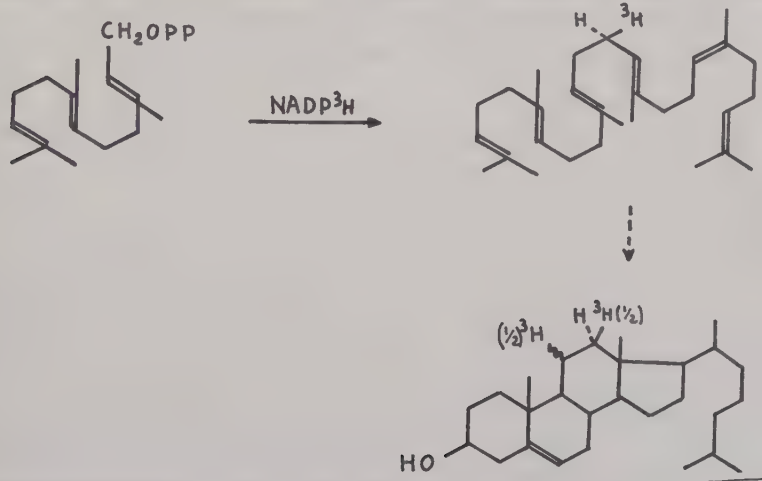
Les deux électrons proviennent du NADPH que l'on sait indispensable à la réaction. Par analogie avec les autres oxidases connues, un ion métallique est supposé servir de transporteur d'électrons (les agents chélatants sont d'ailleurs inhibiteurs).

Mise en conformation du squalène

Le squalène étant un hydrocarbure symétrique et sans groupe polaire la nature de l'interaction squalène-enzyme pose un problème intéressant, mais les difficultés de dissolution de cette enzyme en ont longtemps interdit l'étude.

Ce n'est que récemment que Dean et al (12) ont préparé à partir de microsomes de foie de porc une enzyme soluble et partiellement purifiée capable de cycliser l'époxyde de squalène en lanostérol.

Il semble que les enzymes qui synthétisent et cyclisent le squalène agissent indépendamment : par dimérisation de pyrophosphate de farnésyle en présence de $NADP^3H$, on obtient du squalène contenant un atome ^3H localisé en



(10) Voir références au Chapitre VI.

(11) A.H. SOLOWAY, J.Theor.Biol., 13, 429 (1966).

(12) P.D.G. DEAN, P.R.O. de MONTENALLO, K.BLOCH et E.J. COREY, J.Biol.Chem., 242, 3014 (1967).

12 β (ou 11 α). Mais dans le cholestérol obtenu par transformation de ce squalène dans le même milieu la radio-activité est répartie par moitié en 11 et 12 β (13). Ceci indique que l'adsorption du squalène par la surface enzymatique est indépendante de celle de la chaîne farnésyle et qu'il peut y avoir désorption du squalène avant sa cyclisation.

On peut ajouter aussi que la double liaison terminale 24,25 qui ne participe pas à la cyclisation ne semble pas intervenir dans la fixation du squalène à la surface enzymatique : on sait en effet que le diépoxyde 3,4-24, 25 a pu être transformé en époxy 24,25 lanostérol (14).

On voit donc que les travaux réalisés à ce jour ne suffisent pas à définir la nature exacte de l'intéraction stéréospécifique entre le squalène et le système enzymatique qui le cyclise.

---

(13) B. SAMUELSON et D.S. GOODMAN, J.Biol.Chem., 98, 239 (1963).

(14) E.J. COREY et S.K. GROSS, J.Amer.Chem.Soc., 89, 4561 (1967).

C H A P I T R E I I

SÉPARATION ET IDENTIFICATION DES TRITERPÈNES TÉTRACYCLIQUES MONOHYDROXYLÉS NATURELS

ÉTUDES CHIMIO-TAXONOMIQUES DANS LA FAMILLE DES EUPHORBIACÉES—I

INTRODUCTION GÉNÉRALE ET SÉPARATION ET IDENTIFICATION DES TRITERPÈNES TÉTRACYCLIQUES MONOHYDROXYLÉS NATURELS

GÉRARD PONSINET et GUY OURISSON

Institut de Chimie, Strasbourg, France

(*Reçu* 17 *Mai* 1965)

Résumé—Les études chimio-taxonomiques précédentes dans la famille des Euphorbiacées sont discutées. On décrit une méthode analytique de séparation chromatographique et d'identification par RMN des triterpènes tétracycliques monohydroxylés naturels, sous forme d'époxydes-acétates. Les spectres de RMN sont décrits et discutés.

Abstract—Previous chemotaxonomic work on the Euphorbiaceae is reviewed. Methods are described whereby the natural tetracyclic triterpenes can be separated by chromatography and identified by NMR spectroscopy of their epoxide-acetates. NMR results are given and discussed.

INTRODUCTION

Les Euphorbiacées constituent une famille de plus de 7000 espèces réparties en 280 genres présents dans toutes les flores du globe.

La majorité des travaux chimiques effectués à partir de produits extraits de ces plantes s'expliquent par leur intérêt commercial (*Hevea*, *Ricinus*, Manioc), l'activité physiologique que présente la plupart des espèces (*Ricinus*, *Croton*, *Hura*, *Mercurialis*, *Euphorbia* etc.), et les terpènes que beaucoup accumulent (*Beyeria*, *Euphorbia* etc.).

Plusieurs genres de cette famille sont caractérisés par la présence dans leurs tissus de latex, c'est à dire d'une suspension dans l'eau contenant principalement des sels minéraux, des protéines et acides aminés, des terpènes et du caoutchouc. Outre ces constituants majeurs le latex contient des substances responsables de sa toxicité et de ses autres propriétés pharmacologiques (protéases, glucosides, alcaloïdes etc.) et des enzymes et cofacteurs qui en font un milieu physiologiquement actif, le distinguant ainsi d'une simple substance de déchet.

Le genre *Euphorbia* constitue un groupe numériquement très important (1600 espèces) auquel nous nous attacherons plus particulièrement. Après une très rapide revue de quelques produits extraits d'Euphorbiacées nous étudierons de plus près ceux du genre *Euphorbia* en nous attachant principalement à ceux qui permettent des études systématiques à l'intérieur du genre.

Produits Extraits d'Euphorbiacées (*sauf* Euphorbia)

Nous nous contenterons de relever les principaux résultats relatifs aux lipides, terpénoïdes et alcaloïdes.

Lipides:[1] en plus des acides gras saturés et insaturés universels les huiles des Euphor-

[1] W. KARRER, *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser Verlag, Bâle (1958); et E. GILDEMEISTER et F. R. HOFFMANN, *Die ätherischen Öle*, Vol. 5, p. 695, Akademie Verlag, Berlin (1959).

biacées contiennent des acides insaturés non usuels (acide éléaestéarique) ou des acides alcools (acide ricinoléique, acide kamloténique).

Terpénoïdes: On a identifié les produits suivants: *p*-cymol[1] et limonène[1] (*Croton*); diterpènes[2] (*Beyeria* et *Ricinocarpus*) et[3] (*Croton*); squalène[4] (*Ricinus*); lupéol[5] (*Hevea*, *Phyllanthus*); multiflorénol et bauerénol (*Gelonium*);[5] saponines triterpéniques[5] (*Sapium*, *Phyllanthus*, *Mercurialis*); caoutchouc (*Hevea*); glucoside stérolique[5a] (*Aleurites*).

Alcaloïdes. Parmi les nombreux genres où la présence d'alcaloïdes a été signalée, quelques-uns ont conduit à l'isolement de produits dont la structure a été établie. Ceci conduit à distinguer:[6]

Les Phyllanthoïdées qui ne contiennent que des alcaloïdes du type sécurinine: *Phyllanthus*, sécurinine, phyllochrysine; *Securinega*, sécurinine, suffruticosine, dihydrosécurinine, allosécurinine; et *Flueggea*, virosécurinine, norsécurinine.

Les Euphorbioïdées dont la composition en alcaloïdes semble plus variée: différentes espèces de *Croton* ont fourni: pronuciférine, linéarsine, orotonsine, sparsiflorine, (type protoaporphine); acide hydroxy-4 hygrinique, (type stachydrine); vasicine, tumuriquirensine, (type bisbenzylisoquinoléine). *Julocroton*: julocrotine, (dérivé de la phénylalanine). *Alchornea*: yohimbine. *Hippomane*: physostigmine, (base indolique). *Ricinus*: ricinine, et *Trewia*: nudiflorine (type acide nicotinique).

Études Chimiques du Genre Euphorbia

Nous ne distinguerons pas les produits extraits du latex de ceux provenant d'autres parties de la plante. On a isolé du latex d'un grand nombre d'espèces[5] les triterpènes tétracycliques suivants: euphol, euphorbol, tirucallol, cycloarténol, lanostérol, lanosténol, obtusifoldiénol et un certain nombre de produits non identifiés. Des dérivés de l'euphane et du lanostane sont parfois présents dans un même latex.

Les résultats concernant les triterpènes pentacycliques sont moins nombreux:[5] taraxérol et dérivés (*E. regis-Jubeae*, *antiquorum*, *jolkinii*, *hirta* et *resinifera*); friedeline et dérivés (*E. antiquorum* et *hirta*); germanicol (*E. candellila* et *balsamifera*); β-amyrine (*E. hirta* et *resinifera*).

La teneur en *caoutchouc* d'un certain nombre de latex a été déterminée sans d'ailleurs donner lieu à une exploitation. Tous ces latex semblent contenir le polyisoprène. La présence d'*alcaloïdes* a été signalée dans plusieurs espèces (*E. pilulifera*,[7] *gerardiana*,[8] *orientalis*,[9] *peplus*,[10] *rhizoma*,[11] *seguieriana*,[12] *virgata*,[8] *hirta*[13]) mais aucun produit identifié n'a pu être extrait.

---

[2] G. V. Baddeley, A. J. Bealing, P. R. Jefferies et R. W. Rettalack, *Australian J. Chem.* **17**, 908 (1964).
[3] J. S. Birtwistle, D. E. Case, P. C. Dutta, T. G. Halsall, G. Mathews, H. D. Sable et V. Thaller, *Proc. Chem. Soc.* 329 (1962).
[4] W. Dickhart, *Am. J. Pharm.* **127**, 359 (1955).
[5] Bibliographie au chapitre IV

[5a] Y. C. Lee et W. L. Nobles, *J. Am. Pharm. Ass.* **48**, 162 (1959).
[6] Renseignements communiqués par le Professeur Hegnauer.
[7] F. B. Power et H. Browning, *Chem. Zentr.* **I**, 1824 (1913).
[8] D. E. Dionisev et E. E. Chernomaz, *Chem. Abstr.* **34**, 5878 (1940).
[9] S. Y. Solotnitskaya, *Chem. Abstr.* **48**, 11727 (1954).
[10] A. Sharaf, *Brit. Vet. J.* **105**, 128 (1949).
[11] M. Yanagita, *J. Pharm. Soc. Japan* **64**, 9 (1944).
[12] M. S. Stepanyan, *Chem. Abstr.* **59**, 9230 (1963).
[13] F. Haerdi, *Plantes médicinales africaines*, p. 93. Verlag für Recht und Gesellschaft, Bâle (1964).

L'étude des protéines du latex et en particulier celle de l'activité protéolytique de certaines d'entre elles a pu constituer une base de comparaison entre différentes espèces.[14,15] Enfin des produits divers ont fait l'objet d'études isolées: alcools: cyclitols (*E. amygdaloïdes*,[16] *pilulifera*[11]) *lathyris*,[17] *humifosa*,[18] *thymifolia*,[19] *longana*,;[1] octacosanol (*E. regis-Jubeae*[20]); hydrocarbures:[21] hentriacontane (*E. pilulifera*[7]); acides: acide gallique (*E. humifosa*[18]); acide biglandulinique (*E. biglandulosa*[22]); acide β-éthylmalique (*E. biglandulosa*[23]); acide ellagique (*E. formosana*,[25] *royleana*[24]); acide phorbique (*E. palustris*[26]).

Études Chimio-taxonomiques dans le Genre Euphorbia

Les quelques travaux de systématique n'ont pas apporté de contribution très importante à l'étude globale du genre. Une classification[27] de 21 espèces d'après la valeur du point isoélectrique de leur latex a pu être comparée avec succès à une classification botanique; 19 latex d'espèces variées se sont révélé[28] contenir les mêmes 17 acides aminés libres à quelques exceptions près; une étude faite sur 6 espèces seulement[23] semble montrer une distribution assez variable de n-alcanes dans la cire des feuilles.

Études des Triterpènes

Nous avons entrepris une étude systématique des constituants triterpéniques de diverses Euphorbiacées. Cette étude a exigé la mise au point d'une méthode analytique précise et rapide d'identification des triterpènes tétracycliques du latex de ces plantes.

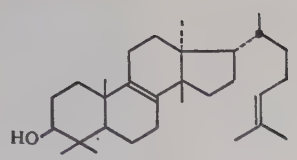
Cette première publication est donc consacrée à la description de la méthode utilisée. Elle est immédiatement suivie d'une seconde publication consacrée à un exemple d'utilisation de cette méthode dans le cas de l'Euphorbiacée ligneuse *Hura crepitans L.* L'étude de nombreuses espèces du genre *Euphorbia* est actuellement très avancée, et nos résultats seront communiqués ultérieurement.

Pour faciliter l'étude analytique de mélanges de triterpènes tétracycliques, nous avons été amenés à utiliser systématiquement les méthodes de "chromatographie fonctionnelle" sur couche mince mises au point par C. Mathis et G. Ourisson.[29]

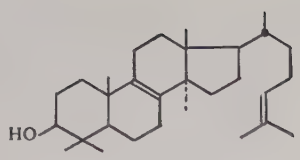
Etant donné la taille des molécules envisagées et leurs grandes ressemblances structurales, les différences de propriétés physiques et de réactivité chimique sont ici estompées et la séparation de ces produits par cristallisation fractionnée ou chromatographie sur couche mince ou colonne (d'alumine, de silice ou de silice imprégnée de nitrate d'argent[30]) est, soit fastidieuse, soit inefficace.

---

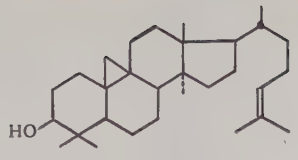
[14] F. G. Lennox et W. J. Ellis, *Biochem. J.* **39**, 465 (1945).
[15] J. Roca, *Annales Inst. Biol.* **18**, 7 (1947).
[16] V. Plouvier, *Compt. Rend.* **236**, 317 (1953).
[17] R. Jaretzky et W. Köhler, *Chem. Zentr.* **I**, 1796 (1943).
[18] K. Huzzi, H. Husikawa et Y. Kudo, *J. Pharm. Soc. Japan* **57**, 140 (1937).
[19] M. Nagase, *Chem. Zentr.* **I**, 359 (1942).
[20] T. Takemoto et M. Inagaki, *Yakugaku Zasshi* **78**, 292 (1958).
[21] G. Eglinton, A. G. Gonzalez, R. J. Hamilton et R. A. Raphael, *Phytochem.* **1**, 89 (1962).
[22] N. P. Kirjalow, *Chem. Zentr.* **I**, 967 (1939).
[23] N. P. Kirjalow, *Chem. Zentr.* **II**, 773 (1940).
[24] R. C. Sharma, A. Zaman et A. R. Kidwai, *Indian J. Chem.* **2**, 254 (1964).
[25] J. Shinoda et C. P. Kun, *Chem. Zentr.* **II**, 2170 (1931).
[26] A. Nordal et G. Ogner, *Acta Chem. Scand.* **18**, 830 (1964).
[27] L. S. Moyer, *Am. J. Botany* **21**, 293 (1934).
[28] C. Montant, *Compt. Rend.* **245**, 1454 (1957).
[29] C. Mathis et G. Ourisson, *J. Chromat.* **12**, 94 (1963).
[30] A. S. Gupta et Sukh Dev, *J. Chromat.* **12**, 189 (1963).



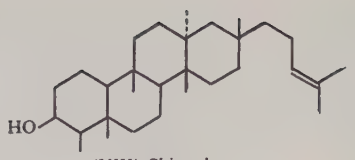
(I) Euphol



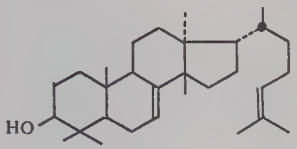
(V) Lanostérol



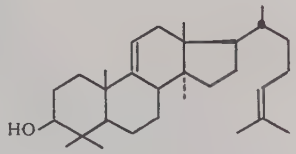
(IX) Cycloarténol



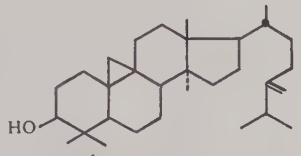
(XIII) Shionol



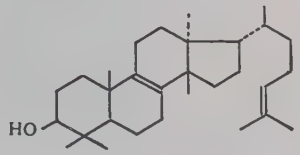
(II) Butyrospermol



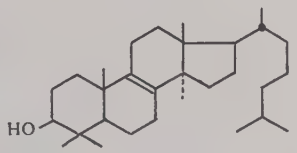
(VI) Parkéol



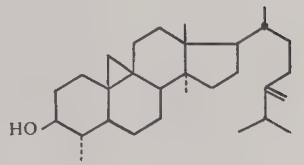
(X) Méthylène-24-Cycloartanol



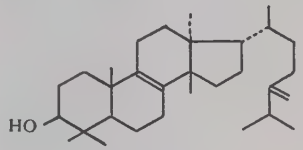
(III) Tirucallol



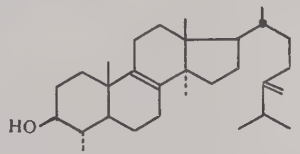
(VII) Lanosténol



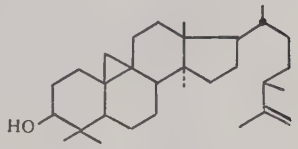
(XI) Cycloeucalénol



(IV) Euphorbol



(VIII) Obtusifoldiénol



(XII) Cyclolaudénol

FIG. 1. TRITERPÈNES TÉTRACYCLIQUES MONOHYDROXYLÉS NATURELS.

De plus, dans une telle série, l'identification de produits par mesures physiques (point de fusion, pouvoir rotatoire) est, elle aussi, aléatoire car elle n'assure pas suffisamment le contrôle de la pureté des produits.

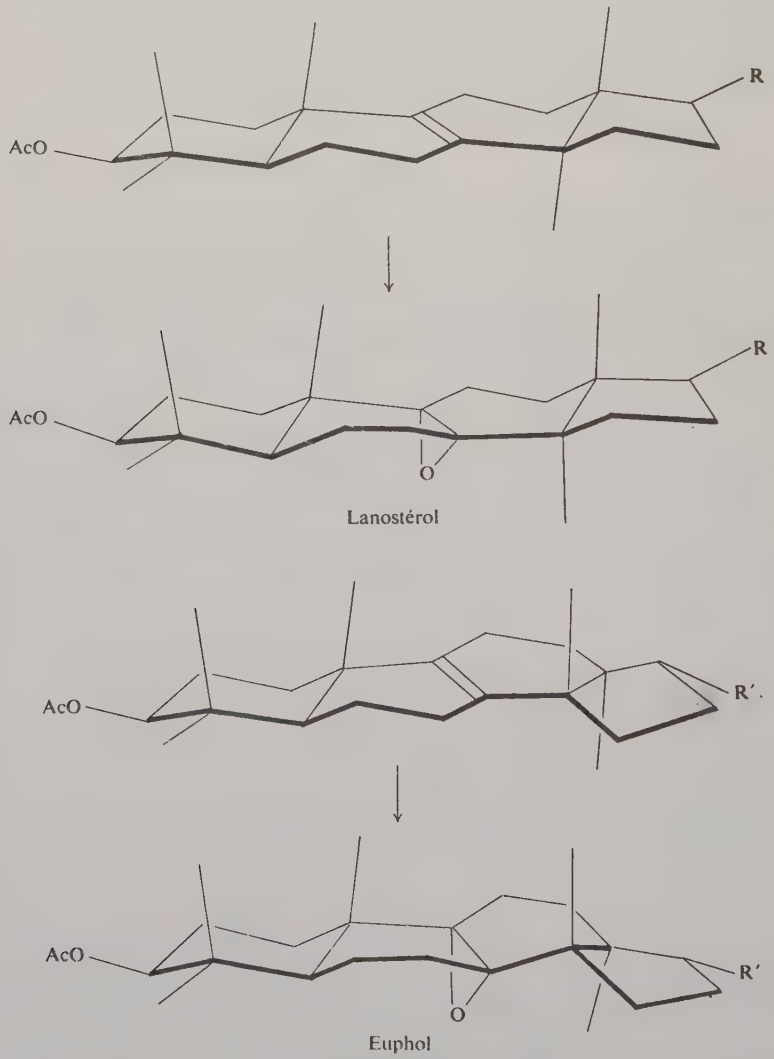


FIG. 2.

Il est à noter que des méthodes de séparation ont pu être décrites dans certains cas (euphol et euphorbol,[31] euphol et tirucallol[32]) mais ces méthodes ne pourraient s'appliquer à des analyses systématiques et rapides utilisant de petites quantités de produit. Enfin, des essais

[31] G. T. NEWBOLD et F. S. SPRING, *J. Chem. Soc.* 249 (1944).
[32] D. W. HAINES et F. L. WARREN, *J. Chem. Soc.* 2554 (1949).

d'identification par chromatographie en phase gazeuse ont été décrits pour des mélanges de ces produits.[33]

Chromatographie des Époxydes

L'utilisation de la chromatographie fonctionnelle nous a amenés à préparer les époxydes par action de l'acide *p*-nitroperbenzoïque en excès, sur les acétates des alcools de la Fig. 1 et de quelques-uns de leurs dérivés (seul le produit VIII n'a pu être étudié, faute d'échantillon de référence). Cette réaction présente l'intérêt d'être totale et les époxydes obtenus sont chromatographiquement séparables. L'introduction d'un ou de deux atomes d'oxygène dans la molécule conduit en effet à un plus grand étalement des polarités. Cette réaction n'étant pas toujours stéréospécifique, il est possible, *a priori*, d'obtenir deux stéréoisomères à partir d'un produit unique.

En fait, dans le cas qui nous intéresse, la présence de groupements méthyles en 10, 13 et 14 oriente en α l'époxydation de la double liaison des cycles B ou C (Fig. 2). La présence d'un centre d'asymétrie en 20 semble suffisante pour conduire, dans la chaîne latérale, à l'un des isomères de préférence à l'autre. Il faut d'ailleurs noter que pratiquement nous n'avons jamais pu, ni les distinguer, ni nous assurer que les deux n'existaient pas.(chap. VII)

L'examen de la chromatoplaque obtenue avec l'ensemble des époxydes-acétates permet de calculer les R_f relatifs donnés dans le Tableau 1.

TABLEAU 1. R_f RELATIF DES DIFFÉRENTS ÉPOXYDES-ACÉTATES PAR RAPPORT A L'ÉPOXYDE-ACÉTATE DE CYCLOARTÉNOL

	R_f relatif*
Monoépoxydes:	
Dihydroeuphorbol	1,26
Dihydroeuphol	
Dihydrobutyrospermol	1,17
Dihydroparkéol	1,15
Méthylène-24-cycloartanol	1,12
Cyclolaudénol	
Cycloeucalénol	
Dihydrolanostérol	1,10
Cycloarténol	1,00
Shionol	0,95
Diépoxydes:	
Euphorbol	0,95
Tirucallol	0,76
Euphol	0,71
Parkéol	0,65
Lanostérol	0,60
Butyrospermol	0,59

* Sur les chromatoplaques de silice éluées deux fois avec cyclohexane:acétate d'éthyle (85:15).

[33] B. CAPELLA, E. FEDELI et M. CIRIMELE, *Chem. & Ind. (London)* 1590 (1963).

On peut ainsi classer les époxydes en deux groupes: (a) monoépoxydes, produits à polarité la plus faible. Dans ce groupe l'époxyde de cycloarténol (IX), époxyde trisubstitué, est plus polaire que ses homologues disubstitués-1,1 (cycloeucalénol (XI), cyclolaudénol (XII), méthylène-24 cycloartanol (X)).

(b) Diépoxydes, produits plus polaires. Dans ce groupe également, l'époxyde d'euphorbol (IV), époxyde disubstitué -1,1 est moins polaire que le groupe des isomères de l'époxyde-acétate de lanostérol (V), époxydes trisubstitués.

La Tableau 1 indique que certains produits sont pratiquement inséparables dans les conditions d'élution utilisées, mais on peut cependant les distinguer par leurs spectres de RMN, lesquels peuvent être mesurés, en micro-cellules, sur quelques milligrammes isolés p.ex. avec une chromatoplaque préparative.

Spectres de RMN des Epoxydes

Quand la différence de polarité le permet, les époxydes sont séparés quantitativement par chromatographie sur colonne ou mieux sur couche mince de silice.

L'absence de réaction quantitative et simple[34] permettant de réduire les époxydes pour obtenir les composés éthyléniques initiaux, nous a obligés à prendre les spectres de RMN des triterpènes à l'état d'époxydes-acétates. L'examen de ces spectres est une méthode sûre d'identification de ces produits (seuls les dérivés de l'euphol et du tirucallol ont des spectres superposables, mais leur R_f sur plaque est différent). Leurs principales caractéristiques sont décrites dans le Tableau 2, où nous avons également mentionné celles des spectres des dérivés hydrogénés des produits I, II, IV et VI (Fig. 1).

L'étude comparative semi-empirique des points communs des spectres et des motifs structuraux communs permet d'attribuer à un certain nombre de protons des signaux déterminés. Ces indications sont portées dans le Tableau 3.

Il faut remarquer que dans le lanostérol le groupement méthyle 14 α est déplacé vers les champs faibles, à 1,13 ppm, à cause du voisinage de l'époxyde en 8–9 α,[35] tandis que dans l'euphol c'est le groupement méthyle 13 α qui se trouve dans le voisinage de l'époxyde et qui est déplacé à 1,07 ppm (Fig. 2).

L'influence du cycle époxydique sur le déplacement chimique des protons voisins a été étudiée en particulier par K. Tori et coll.[36] sans qu'une loi générale ne puisse en prévoir l'effet.

CONCLUSION

Cette méthode analytique, qui est de mise en œuvre facile et n'exige que de faibles quantités de produit (la limite inférieure est imposée par le spectrographe de RMN), ne peut manquer de trouver des applications dans les études phytochimiques relatives aux triterpènes: chimio-taxonomie,[37] études biogénétiques[38] etc.

D'autre part les conclusions tirées de l'étude de RMN devraient pouvoir faciliter l'établissement de structures nouvelles en série triterpénique.

---

[34] C. B. Scott, *J. Org. Chem.* **22**, 1118 (1957).
[35] D. E. Case, Travaux non publiés.
[36] K. Tori, K. Kitahonoki, Y. Takano, H. Tanida et T. Tsuji, *Tetrahedron Lett.* 559 (1964); et P. Laszlo, *Bull. Soc. chim. France*, 2660 (1964).
[37] G. Ponsinet et G. Ourisson, Communication suivante (*Phytochem.* **4**, 813 (1965). (chap. IV)
[38] G. Ponsinet et G. Ourisson, (chap. V)

TABLEAU 2. PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES SPECTRES RMN DES ÉPOXYDES-ACÉTATES DE TRITERPÈNES (PPM PAR RAPPORT AU TMS)

Epoxyde acétate de	Groupements méthyles			Protons	
	Méthyles portés par un carbone de l'époxyde	Méthyles déplacés vers les champs faibles	Autres méthyles par ordre d'importance décroissante des signaux	Protons portés par un carbone de l'époxyde	Protons du cyclopropane
I. Euphol	1,25 1,30	1,07	0,83 0,88 0,75	triplet 2,65	
II. Butyrospérmol	1,25 1,30	1,00	0,85 0,93 1,00	triplet 2,88 triplet 2,68	
III. Tirucallol	1,25 1,30	1,07	0,83 0,88 0,77 0,95	triplet 2,67	
IV. Euphorbol		1,07	0,83 0,87 0,75 0,95	doublet 2,55 (J=1)	
V. Lanostérol	1,25 1,30	1,13	0,85 0,90 0,83 0,78	triplet 2,67	
VI. Parkéol					
VII. Lanosténol		1,13	0,90 0,82 0,83 0,77		
VIII. Obtusifoldiénol					
IX. Cycloarténol	1,25 1,30		0,88 0,85 0,97	triplet 2,67	0,30 0,33 0,55 0,63
X. Méthylène-24 cycloartanol			0,88 0,85 0,95	doublet 2,57 (J=1)	0,28 0,33 0,55 0,62
XI. Cycloeucalénol			0,90 0,97 0,85	doublet 2,55 (J=1)	0,13 0,17 0,33 0,45
XII. Cyclolaudénol	1,25		0,88 0,83 0,95	doublet 2,55 (J=1)	0,28 0,33 0,55 0,60
XIII. Shionol	1,25 1,30		0,88 0,92 1,07	triplet 2,67	
IA. Dihydroeuphol		1,07	0,825 0,84 0,91 0,88 0,74		
IIA. Dihydrobutyrospermol		1,00	0,92 0,85 0,82 0,99		
IVA. Dihydroeuphorbol		1,07	0,83 0,88 0,90 0,91 0,76		
VIA. Dihydroparkéol		1,20	0,87 0,90 0,80	mult. 3,04	

Tableau 3. Identification de certains signaux des spectres

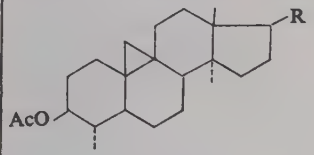
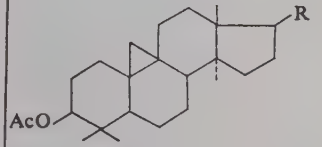
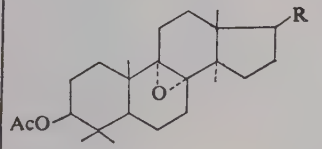
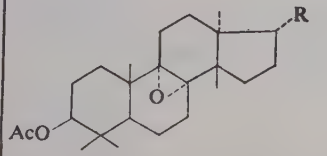
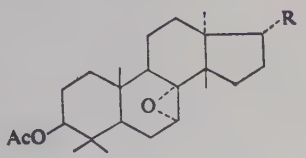
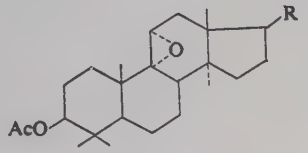
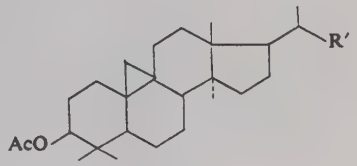
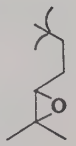
Motif structural	Position des protons	Signal	Position en ppm	Produits possédant ce motif
	Protons du cyclopropane	m	0,13 0,17 0,33 0,45	XI
	Protons du cyclopropane	m	0,28 0,33 0,55 0,62	IX, X, XII
	14α Me	s	1,13	V, VII
	13α Me	s	1,07	I, III, IV, IA, IVA

TABLEAU 3—(suite)

Motif structural	Position des protons	Signal	Position en ppm	Produits possédant ce motif
	13α Me	s	1,00	II, IIA
	14α Me		1,20	VIA
	Ensemble des méthyles en 4α, 4β, 13α, 14β, 20β	3 pics	0,88 0,85 0,97	IX, X, XII
	Méthyles en 26 et 27 Proton en 24	2 s t	1,25 1,30 2,67	I, II, III, V IX, XIII

	Protons en 28	d (J=1Hz)	2,55	IV, X, XL
	Méthyle en 26 Protons en 27	s d (J=1Hz)	1,25 2,55	XII
	Méthyles en 26 et 27	2 pics	0,90 0,82	VII, IA, IIA, IVA

Tableau 3 (suite)

PARTIE EXPERIMENTALE

Les données physiques permettant la caractérisation des époxydes ainsi que l'origine des produits sont données dans le Tableau 4.*

TABLEAU 4. CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES ET ORIGINE DES PRODUITS

Epoxyde acétate de	Points de fusion: °C		Analyse C% H% Valeurs		Origine des produits
	De la litérature	Mesurés	Calc.	Trouv.	
I. Euphol	180–181[39]	182–183	76,75	76,6	Extraction d'Euphorbium[3]
II. Butyrospermol					P. A. Robins
III. Tirucallol		163–165			D. Arigoni
IV. Euphorbol		193–196	77,00	77,0	
			10,58	10,66	F. L. Warren
V. Lanostérol	194–198[35]	193–195	76,75	77,0	D. E. Case
			10,46	10,5	
VI. Parkéol					K. Schreiber
VII. Lanosténol	142[35]	140,5–141,5	78,96	78,9	D. E. Case
			11,19	11,04	
IX. Cycloarténol	141–142[40]	143,5–144	79,28	79,2	
			10,82	10,72	K. Schreiber
X. Méthylène-24 cycloartanol		137–137,5	79,46	79,4	
			10,92	10,97	G. Ohta
XI. Cycloeucalénol		121–122	79,28	79,1	
			10,82	10,81	J. G. King
XII. Cyclolaudénol	153–154[41]	130–131			G. Berti
XIII. Shionol		180–183			F. Patil
IA. Dihydroeuphol	178–178,5[39]	176–177	78,96	78,9	
			11,19	11,08	
IIA. Dihydrobutyrospermol		165–167			P. A. Robins
IVA. Dihydroeuphorbol		198–200	79,15	79,2	
			11,28	11,36	
VIA. Dihydroparkéol		185,5–186,5	78,96	79,2	Isomérisation du cycloartanol
			11,19	11,05	selon K. Schreiber[42]

Methodes Chimiques

Les hydrogénations des produits I, II, IV et VI sont faites dans l'acétate d'éthyle en présence d'oxyde de platine à pression ordinaire.

Les acétylations sont effectuées dans la pyridine anhydre avec de l'anhydride acétique en excès (12 h à température ordinaire).

Les époxydations sont faites dans le chloroforme avec de l'acide *p*-nitroperbenzoïque à 100 pour cent d'excès (12 h à température ordinaire).

* La recristallisation dans l'éther–méthanol n'a pas présenté de difficultés particulières, du moins pour les échantillons suffisamment abondants. Les spectres de RMN montrent qu'il n'y a pas de décomposition du cycle époxydique 8-9α signalée par J. FRIED, J. W. BROWN et M. APPLEBAUM, *Tetrahedron Lett.* 849 (1965).

[39] J. B. BARBOUR, *J. Chem. Soc.* 2534 (1951).
[40] P. BENVENISTE, Thèse Docteur-ingénieur, Strasbourg (1964).
[41] H. R. BENTLEY, *J. Chem. Soc.* 596 (1955).
[42] K. SCHREIBER et G. OSSKE, *Tetrahedron* **20**, 1803 (1964).

Séparation Chromatographique

Les chromatoplaques sont faites de silice Merck ("G nach Stahl") à raison de 1,5 g pour une plaque de 12 × 9 cm. Les plaques sont éluées successivement deux fois avec un mélange cyclohexane: acétate d'éthyle 85:15 et révélées à l'acide sulfurique concentré.

Les points de fusion sont pris au microscope Reichert corrigé et les analyses faites sur des quantités de l'ordre du milligramme. Les spectres de RMN sont pris dans $CDCl_3$ sur un appareil Varian 60 M cycles.

Remerciements—Nous remercions particulièrement, outre les collègues qui nous ont fourni les produits de référence, le Professeur B. Eistert (Saarbrücken) pour les résultats d'ultra-micro analyses, le Dr. D. Case pour sa collaboration pour la préparation des époxydes de lanostérol et de lanosténol, Mlle M. Munier pour les spectres de RMN, et le Dr. P. Benveniste pour ses nombreux conseils.

Ce travail a été aidé par la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Contrat 63-FR-035) et la Direction des Recherches et Moyens d'Essais (Contrats 63-34103 et 64-34-216), que nous remercions ici.

C H A P I T R E I I I

TRITERPÈNES DE *Hura crepitans*

ÉTUDES CHIMIO-TAXONOMIQUES DANS LA FAMILLE DES EUPHORBIACÉES—II

TRITERPÈNES DE *HURA CREPITANS* L.

GÉRARD PONSINET et GUY OURISSON

Institut de Chimie, Strasbourg, France

(*Reçu* 17 *Mai* 1965)

Résumé—La présence de méthylène-24 cycloartanol, cycloarténol et butyrospermol dans le latex de *Hura crepitans* L. est démontrée et discutée.

Abstract—The presence of 24-methylene cycloartanol, cycloartenol and butyrospermol in the latex of *Hura crepitans* L. is demonstrated, and is discussed in relation to their biogenesis.

INTRODUCTION

DEPUIS les travaux de Newbold et Spring[1] sur l'"Euphorbium" dont ils ont extrait l'euphol et l'euphorbol un grand nombre de triterpènes ont été extraits du latex de différentes espèces de la famille des Euphorbiacées, surtout du genre *Euphorbia*.[2]

En particulier un certain nombre de triterpènes tétracycliques de structure connue ont été extraits de ces latex: euphol, tirucallol, euphorbol, lanostérol, lanosténol, obtusifoldiénol, et cycloarténol, outre un certain nombre d'autres produits dont la structure n'a pas été établie ou qui n'ont été obtenus qu'à l'état de mélanges.

RESULTATS

La publication précédente[3] avait pour but d'exposer une méthode analytique permettant de séparer et d'identifier tous les triterpènes tétracycliques monohydroxylés naturels connus.

Cette méthode a été appliquée à l'étude d'un latex très toxique, provenant de *Hura crepitans* L., arbre d'origine américaine poussant en Côte d'Ivoire. Nous avons mis en évidence la présence de trois produits majeurs: méthylène-24 cycloartanol, cycloarténol, et butyrospermol.

Ce résultat appelle plusieurs commentaires. Ces produits existent dans le latex à l'état d'alcools et non d'esters, comme le montre la Fig. 1, bien que de nombreux alcools triterpéniques existent à l'état naturel sous forme d'esters. Gonzalez[4] a décrit en détail plusieurs conditions de saponification d'extraits de latex.

Deux des produits ainsi trouvés n'avaient pas encore été isolés d'Euphorbiacées (méthylène-24 cycloartanol et butyrospermol).

---

[1] G. T. NEWBOLD et F. S. SPRING, *J. Chem. Soc.* 249 (1964).

[2] Pour la bibliographie sur ces nombreux travaux se reporter à l'ouvrage de P. BOITEAU, B. PASICH et A. R. RATSIMAMANGA, *Les Triterpénoïdes en Physiologie végétale et animale*, Gauthier-Villars, Paris (1964).

[3] G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* **4**, 799 (1965) (chap. II)

[4] A. G. GONZALEZ et L. G. MORA, *Anales Real Soc. Espan. Fis. y Quim., Madrid* **48B**, 483 (1952) et *Chem. Abstr.* **48**, 7039 h (1954).

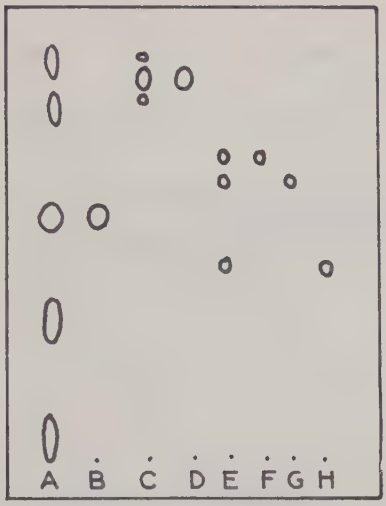


FIG. 1. CHROMATOPLAQUE DE SILICE MERCK G (1,5 g)

Elution Cyclohexane: Acétate d'éthyle (7:3). Révélation: acide sulfurique concentré. A—extrait total à l'éther de pétrole. B—fraction de l'insaponifiable éluée au mélange benzène:éther (8:2). C—mélange d'acétates. D—fraction majeure du mélange d'acétates soumise à l'époxydation. E—mélange d'époxydes. F—époxyde acétate de 24-méthylène cycloartanol. G—époxyde acétate de cycloarténol. H—époxyde acétate de butyrospermol.

La présence simultanée de produits biogénétiquement différents comme le butyrospermol et le cycloarténol laisse supposer que dans un même latex il existe des enzymes capables de cycliser le squalène en deux squelettes différents. On sait en effet depuis les travaux de Teas,[5] Bonner[6] et Lynen[7] que, du moins pour *Hevea brasiliensis*, c'est dans le latex lui-même qu'est synthétisé le pyrophosphate d'isopenténylе, précurseur commun au caoutchouc et aux triterpènes.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Un volume de 300 ml de latex est additionné de 600 ml d'éthanol et centrifugé pour séparer l'abondante substance protéique qui précipite. La solution alcoolique est concentrée et le résidu résineux est mélangé avec du sable et de la terre à infusoires pour en faire un mélange pulvérulent qui est ensuite extrait à l'éther de pétrole dans un extracteur Soxhlet avec l'éther de pétrole.

L'extrait total (8 g) est saponifié par la potasse alcoolique à reflux pendant 2h, et l'insaponifiable est chromatographié sur alumine. La fraction éluée au mélange benzène:éther, 80:20 (0,5 g) est acétylée par addition de 200 mg d'anhydride acétique dans la pyridine anhydre (12 heures à température ordinaire). Le mélange d'acétates est extrait et chromatographié. Le produit majeur (200 mg) est un mélange inséparable de plusieurs acétates.

Ce mélange est traité 12 h à température ordinaire par 300 mg d'acide *p*-nitroperbenzoique dans 50 ml de chloroforme. Le mélange d'époxydes est extrait et fractionné sur

[5] H. J. TEAS et R. S. BANDURSKI, *Plant Physiol.* **32**, 643 (1957).
[6] R. B. PARK et J. BONNER, *J. Biol. Chem.* **233**, 340 (1958).
[7] F. LYNEN et U. HENNING, *Angew. Chem.* **72**, 820 (1960).

chromatoplaque préparative. On sépare ainsi trois produits majeurs identifiés par leur R_I sur chromatoplaque et RMN[3] (méthylène-24 cycloartanol, 40 mg; cycloarténol, 24 mg; et butyrospermol, 48 mg).

Les spectres de RMN sont pris dans le deutérochloroforme sur un appareil VARIAN A-60. Leurs caractéristiques sont données dans la publication précédente.[3]

Remerciements—Nous remercions M. Garnier à Bouaké (République de Côte d'Ivoire) pour l'envoi de latex et Mlle M. Munier pour la prise des spectres de RMN.

Ce travail a été aidé par la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Contrat 63-FR-035) et la Direction des Recherches et Moyens d'Essais (Contrats 63-34103) et 64-34-216), que nous remercions.

C H A P I T R E IV

RÉPARTITION DES TRITERPÈNES DANS LES LATEX D'EUPHORBIA

ÉTUDES CHIMIOTAXONOMIQUES DANS LA FAMILLE DES EUPHORBIACÉES—III.

RÉPARTITION DES TRITERPÈNES DANS LES LATEX D'*EUPHORBIA*

G. PONSINET et G. OURISSON

Laboratoire associé au CNRS
Institut de Chimie, Esplanade, 67 Strasbourg, France

(*Received* 5 *July* 1967)

Résumé—La fraction triterpénique du latex de 75 espèces d'*Euphorbia* a été analysée par chromatographie. 15 triterpènes tétra- et pentacycliques ont ainsi été identifiés. Les résultats d'analyse permettent de rassembler les espèces en groupes chimiquement homogènes, qui correspondent le plus souvent avec les sections ou sous-sections du genre établies sur des critères botaniques.

Abstract—The latex of 75 *Euphorbia* species have been examined for their triterpenes. Fifteen tetra- and pentacyclic triterpenes have been identified by TLC and GLC. The groups constituted by chemical criteria can be correlated with sections and sub-sections and particularly with morphological, morphogenetical and geographical characteristics.

INTRODUCTION

LE GENRE *Euphorbia*, qui comprend plus de 1500 espèces cosmopolites, herbacées, cactiformes ou arbustives, est le plus vaste groupement d'espèces de la famille des Euphorbiacées. La plus récente révision d'ensemble, celle de Boissier,[1] et la monographie la plus récente, de Berger,[2] ne couvre que les espèces succulentes. Il était inévitable, en l'absence d'une étude critique d'ensemble rendue périlleuse par l'étendue de la tâche, que des tendances à la division se manifestent: plus de cinquante genres ont été introduits puis considérés comme synonymes. On mesure à ces quelques remarques la prétention qu'il y aurait à espérer qu'une étude chimique soit décisive dans un domaine aussi vaste et aussi mal préparé.

Nous avons profité de la mise au point d'une méthode analytique efficace[3] pour examiner la composition en triterpènes des latex de 75 espèces d'*Euphorbia*, et les résultats que nous décrivons ci-dessous semblent utilisables du point de vue de la systématique.

TRITERPÈNES DES LATEX D'*EUPHORBIA*

L'étude des latex semblait *a priori* intéressante. Dans une vingtaine d'espèces, Moyer avait noté des relations significatives entre la classification d'une part, et le point isoélectrique et les courbes de mobilité électrophorétique des particules du latex d'autre part.[4] Nous-mêmes avons récemment utilisé des latex d'*Euphorbia* dans des expériences de biosynthèse,[5] suivant en cela l'exemple donné par plusieurs auteurs avec les latex d'une autre Euphorbiacée, *Hevea*. Enfin, le Tableau 1 résume les résultats épars dans la littérature sur les triterpènes

[1] E. BOISSIER, *Prodomus Systematis*, A. de Candolle, Vol. 15, p. 3 (1866).
[2] A. BERGER, *Sukkulente Euphorbien*, Stuttgart (1907).
[3] G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* 4, 799 (1965). (chap. II)
[4] L. S. MOYER, *Am. J. Botany*, 21, 293 (1934).
[5] G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* 6, 1235, (1967)

TABLEAU 1. TRITERPÈNES EXTRAITS D'*Euphorbia*

Squelette	Tétracycliques								Pentacycliques									Références
	Euphane			Lanostane					Oléanane					Lupane	Ursane			
Produit / Espèces	euphol	euphorbol	tirucallol	cycloarténol	méthylène-24 cycloartanol	lano stérol	lanosténol		β-amyrine	germanicol	taraxérol	friedelanol	gluténol	lupéol	α-amyrine	taraxastérol		
Euphorbia adenochlora Morr.	+			+							+							6
E. antiquorum L.	⊕										+	+						7
E. aphylla Brouss.				⊕		⊕	⊕											8
E. atropurpurea Brouss.				⊕		⊕	⊕											9
E. balsamifera Ait.				⊕		⊕				⊕								10, 11
E. bravoana Svent.				⊕		⊕	⊕											12
E. canariensis L.	⊕	⊕																13
E. cyparissias L.	+				+				+				+					14
E. dracunculoides Lam.		+																15
E. echinus Hook						⊕	⊕											9
E. handiensis Burch.	⊕			⊕														16
E. hernandes-pachecoi Cab.				⊕		⊕	⊕											9
E. hirta L.									+		+							17, 18
E. ingens E. Mey.	⊕	⊕																19
E. jolkini Boiss.											+							18
E. nerifolia L.	⊕																	20
E. obtusifolia Poir.				⊕														21
E. pulcherrima Wild.										+					+			22
E. regis-jubae Web.						⊕	⊕				⊕							12, 18
E. resinifera Boiss.	⊕	⊕							⊕		⊕							23, 24
E. royleana Boiss.											+		+					25
E. thymifolia L.			+								+							26
E. tirucalli L.	⊕		⊕													⊕		27, 28
E. triangularis Desf.	⊕																	27
E. watanabei Mak.											+			+		+		29

⊕ Triterpènes extraits du latex isolé.
\+ Triterpènes extraits de la plante entière.

d'*Euphorbia*. Quinze triterpènes de structure établie avaient déjà été isolés dans l'une ou l'autre espèce par nos prédécesseurs.

Le Tableau 1 montre, pour les 25 espèces mentionnées, une très grande variété de constituants, en particulier la présence de nombreux triterpènes tétracycliques des séries de l'euphane et du lanostane, accompagnés de triterpènes pentacycliques de squelettes variés. Si tous les organismes vivants—sauf les bactéries—sont capables de synthétiser et de cycliser le squalène, seuls les végétaux semblent pouvoir transformer ce produit en triterpènes différents du lanostérol, lui-même considéré comme le précurseur des stérols, tant végétaux qu'animaux. Parmi les produits mentionnés dans le Tableau 1, certains (cycloarténol, méthylène-24 cycloartanol, α- et β-amyrines, taraxérol, lupéol) sont très largement répandus chez les végétaux; par contre, le tirucallol n'a été trouvé que dans quelques Anacardiacées; quant à l'euphol et l'euphorbol, ils semblent jusqu'ici spécifiques des Euphorbes.[30] Le butyrospermol, produit très voisin de l'euphol et que nous retrouverons plus loin, a été trouvé dans une Sapotacée.

L'utilisation directe des résultats du tableau 1 dans un but de systématique est très délicate, car pour beaucoup d'espèces mentionnées l'inventaire des produits n'est pas complet. De plus dans certains cas la plante entière avait été extraite. Nous avons fait remarquer[5] que les latex sont beaucoup plus riches en triterpènes que la plante. Leur faible teneur en phytostérols, et l'absence de triterpènes caractéristiques des cires et des cuticules,[31] rendent beaucoup plus aisés l'isolement et la caractérisation des triterpènes.

Nous avons donc procédé à une analyse systématique des triterpènes tétracycliques des latex de diverses espèces d'*Euphorbia*. La présentation de nos résultats sera faite en suivant les sections du genre d'après Pax et Hoffmann[32] qui ont repris les classifications de Boissier et de Berger.

---

[6] T. Takemoto, Y. Kondo et T. Ishiguro, *Yakugaku Zasshi* **86**, 528 (1966).
[7] V. Anjaneyulu, D. N. Rao et L. R. Row, *J. Indian Chem. Soc.* **44**, 123 (1967).
[8] A. G. Gonzalez et A. H. Toste, *Anales Real Soc. Españ Fis. y Quim.* **50b**, 597 (1954).
[9] A. G. Gonzalez et R. Barrera, *Publ. Inst. Quim. Fis. A. Barba* **10**, 199 (1956).
[10] S. Chapon et S. David, *Bull. Soc. Chim. France* **456**, (1952).
[11] A. G. Gonzalez et M. L. G. Mora, *Publ. Inst. Quim. Fis., A. Barba* **6**, 152 (1952).
[12] A. G. Gonzalez et A. G. Padron, *Anales Real. Soc. Españ. Fis. y Quim.* **54b**, 695 (1958).
[13] A. G. Gonzalez et A. Calero, *Anales Real. Soc. Españ. Fis. y Quim.* **45b**, 269 (1949).
[14] A. N. Starrat, *Phytochem.* **5**, 1341 (1966).
[15] A. Singh et S. N. Srivastava, *Indian J. Chem.* **4**, 420 (1966).
[16] A. G. Gonzalez et A. Calero, R. Calero, *Anales. Real. Soc. Españ. Fis. y Quim.* **45b**, 1441 (1949).
[17] H. Estrada, *Bol. Inst. Quim. Univ. Nac. Auto Mex.* **11**, 15 (1959).
[18] T. Takemoto et M. Inagaki, *Yakugaku Zasshi* **78**, 289 (1958).
[19] R. N. E. Bennett, H. S. Krüsi et F. L. Warren, *J. Chem. Soc.* 2534 (1951).
[20] D. N. Rao et L. R. Row, *Current Sci.* (*India*) **34**, 432 (1965).
[21] A. G. Gonzalez et J. L. Breton, *Anales Real. Soc. Españ Fis. y Quim.* **47b**, 363 (1951).
[22] H. N. Khastgir et B. P. Pradhan, *J. Indian Chem. Soc.* **44**, 159 (1967).
[23] G. Dupont, W. Kopaczewski et R. Brodski, *Bull. Soc. Chim. France* 1068 (1947).
[24] G. Dupont, M. Julia et W. R. Wragg, *Bull. Soc. Chim. France* 852 (1953).
[25] P. Sengupta et S. Ghosh, *J. Indian Chem. Soc.* **42**, 543 (1965).
[26] D. R. Gupta et S. K. Garg, *Ind. J. Appl. Chem.* **29**, 39 (1966).
[27] A. D. McDonald, F. L. Warren et J. M. Williams, *J. Chem. Soc.* 1558 (1949).
[28] D. W. Haines et F. L. Warren, *J. Chem. Soc.* 2554 (1949).
[29] T. Takemoto et T. Ishiguro, *Yakugaku Zasshi* **86**, 530 (1966).
[30] Pour une étude complète de ces problèmes voir P. Boiteau, B. Pasich et A. R. Ratsimamanga, *Les Triterpénoïdes en Physiologie végétale et animale*. Gauthier-Villars, Paris (1964); G. Ourisson, P. Crabbe et O. R. Rodig, *The Tetracyclic Triterpenes*. Herrmann, Paris (1964); G. Ponsinet, G. Ourisson et C. Oehlschlager, *Symposium on Recent Advances in Phytochemistry*. Austin, Texas (1966).
[31] H. Estrada, *Bol. Inst. Quim. Univ. Nac. Auto Mex.* **8**, 30 (1956).
[32] F. Pax et K. Hoffmann, *Natürlichen Pflanzenfamilien* **19c**, 208 (1931).

MATÉRIEL D'ÉTUDE

La très grande dispersion géographique d'un groupe aussi important rend très difficile la récolte d'un nombre représentatif d'échantillons de chaque section du genre. Notre étude n'est donc pas complète; seules les deux sections les plus importantes numériquement, *Tithymalus* et surtout *Euphorbium*, ont été explorées en quelque détail, les autres sections n'étant représentées dans notre étude que par un nombre limité d'espèces. L'importance accordée ici à la section *Euphorbium* n'est pas totalement fortuite: c'est en effet la section qui présente la plus grande variété morphologique et la plus grande dispersion géographique.

Origine des Plantes

Les espèces étudiées sont de trois origines principales: —espèces spontanées de diverses régions de France, identifiées à l'Institut de Botanique de Strasbourg; —espèces de serre fournies par: le Jardin Botanique de l'Université de Strasbourg; le Royal Botanic Garden de Kew; le Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris; des commerçants en plantes de collection; —espèces tropicales provenant de diverses régions d'Afrique et principalement du Parc Botanique de Tzimbazaza (Madagascar).

Quelques espèces ont été obtenues de plusieurs sources ou sous forme de variétés différentes; leur analyse a conduit à des résultats reproductibles.

Préparation des Extraits et Méthodes d'Analyse

Le latex, prélevé par incision ou section de tige, est séché par lyophilisation, puis extrait à l'éther de pétrole. La plupart des analyses ont été faites à partir de quelques gouttes de latex. Dans quelques cas, la plante entière a été séchée à 50° sous vide, broyée et extraite à l'éther de pétrole. Dans chacun de ces extraits nous avons étudié les triterpènes libres, et dans quelques cas les triterpènes estérifiés, habituellement peu abondants. Les produits ont été caractérisés par chromatographie en couche mince de leurs époxydes-acétates,[3] par chromatographie gazeuse et par RMN. Pour la chromatographie gazeuse, l'extrait est simplement adsorbé sur une colonne de silice imprégnée de 10% de nitrate d'argent; après élution par un mélange éther de pétrole–éther 80/20, une deuxième élution par un mélange semblable 50/50 entraîne les triterpènes qui sont alors injectés dans l'appareil. Les conditions opératoires, et les temps de rétention sont mentionnés dans le Tableau 2.

TABLEAU 2. CHROMATOGRAPHIE DES TRITERPÈNES EN PHASE GAZEUSE

Produits	Temps de rétention (min)
Euphol	17,5
Tirucallol	19,2
Lanostérol	20,7
β-Amyrine	21,5
Euphorbol	22,7
α-Amyrine	23,4
Cycloarténol	24,3
Méthylène-24 cycloartànol	28,2

Appareil Pan-Chromatograph PYE.
Colonne Chromosorb W/1% SE 52.
Température: 240°.
Débit d'argon: 80 ml/min.

L'analyse chromatographique par l'une ou l'autre méthode peut être réalisée sur 1 mg d'extrait sec. Pour une confirmation par RMN, des quantités plus grandes sont nécessaires.

Les triterpènes tétracycliques rencontrés sont les suivants: euphol, butyrospermol, tirucallol, euphorbol, cycloarténol, méthylène-24 cycloartanol, lanostérol, lanostènol et cycloartène-23 diol-3$_\beta$, 25. Dans quelques cas, des triterpènes pentacycliques ont également été identifiés (lupéol, α- et β-amyrines).

RÉSULTATS ANALYTIQUES

Nous avons analysé les triterpènes de 73 espèces d'*Euphorbia* ainsi que de deux autres Euphorbiacées voisines: *Synadenium grandtii* et *Elaeophorbia grandifolia*. L'ensemble

TABLEAU 3. CONSTITUANTS CHIMIQUES ET HABITAT DES ESPÈCES ÉTUDIÉES RÉPARTIES SUIVANTS LES SECTIONS DE PAX ET HOFFMANN[32]

Section	Sous-section		Espèces		Habitat naturel	Type de constituants
Anisophyllum			*hirta* L.		Amérique	C2
Adenopetalum			*marginata* Pursh.		Amérique	C1
Pseudeuphorbium			*monteirii* Hook.		Afrique	C
Poinsettia			*heterophylla* L.	*pulcherrima* Willd.	Amérique	E
Euphorbium	Arthrothamnus		*brachiata* E Mey.		Afrique	C1
	Tirucalli		*aphylla* Brouss. *mauritanica* L.	*obtusifolia* Poir. *shimperi* Presl.	Afrique	C1
			enterophora Drake. *intysi* Drake. *laro* L.	*oncoclada* Drake. *stenoclada* Baill. *tirucalli* L.	Madagascar	B
	Pteroneura		*sipolisii* N.E.Br.		Afrique	C
	Goniostema		*leuconeura* Boiss. *lophogona* Lam.	*neohumberti* Boit. *viguieri* M.Den.	Madagascar	C3
	Diacanthium	Splendentens	*capuroni* Ursch et Léandri *delphinsis* Ursch et Léandri *didieroides* M. Den. *durani* Ursch et Léandri *fianarantsoe* Ursch et Léandri *genoudiana* Ursch et Léandri	*milii* Desm. *mitsembinensis* Ursch et Léandri *pauliani* Ursch et Léandri *pedilanthoides* M.Den. *perrieri* Drake.	Madagascar	C3
		Trigonae	*grandidens* Haw. *lactea* Haw.	*royleana* Boiss. *trigona* Haw.	Afrique et Inde	A
		Polygonae	*abyssinica* Raeus. *ammak* Schw. *canariensis* L. *candelabrum* Trém. *cristata* Lem. *deightoni* L.Cr. *erythraea* Hemsl.	*hermentiana* Lem. *ingens* E. Mey. *kamerunica* Pax. *resinifera* Berg. *sudanica* A.Chev. *triangularis* Desf. *virosa* Willd.	Afrique	A
			echinus Hook.	*officinarum* L.	Afrique N.	D

	Anthcantha	*enopla* Boiss.	*mamillaris* L.	Afrique S.	C4
	Medusea	*caput-medusae* L. *gatbergensis* N.E.Br.	*pugniformis* Boiss.	Afrique S.	C4
Tithymalus	Decussatae	*lathyris* L.		Europe	C1
	Pachycladae	*atropurpurea* Brouss. *balsamifera* Ait.	*dendroides* L. *regis-jubae* Webb.		
	Carunculares	*serrata* L.			
	Galarrhaei	*coralloides* L. *epithymoides* Jacq.	*helioscopia* L. *verrucosa* Lam.		
	Esulae	*amygdaloides* L. *cyparissias* L. *exigua* L.	*paralias* L. *peplus* L.		
	Myrsinites	*myrsinites* L.			
Elaeophorbia grandifolia L.Cr. *Synadenium grantii* Hook				Afrique W.	B

des résultats est condensé dans le Tableau 3, où est indiquée également l'origine géographique naturelle des groupes d'espèces obtenus

Les différents latex étudiés se répartissent en effet en groupes, à l'intérieur desquels, la composition en triterpènes tétracycliques est à peu près constante. Ces groupes sont caractérisés par cinq types principaux de constituants.

Type A: euphol + euphorbol dans le rapport 2/1 environ; *Type B:* euphol + tirucallol dans le rapport 2/1; *Type C:* cycloarténo1 + méthylène-24 cycloartanol comme produits majeurs.

Le type constitué par le mélange de ces deux produits n'est pas vraiment caractéristique, et l'étude des constituants mineurs permet les subdivisions suivantes:

C1: présence de lanostérol en quantité variable et généralement faible. Dans deux espèces (*E. obtusifolia* et *E. aphylla*) nous avons en outre décelé la présence d'environ 2% de lanosténol, et dans une (*E. cyparissias*) 3% d'euphol. Des triterpènes pentacycliques non identifiés sont également présents.

C2: présence de β-amyrine et de lupéol (*E. hirta*).

C3: faible proportion de méthylène-24 cycloartanol par rapport au cycloarténo1; présence de butyrospermol (10%) et de β-amyrine (10–20%).

C4: présence de 5% de mélange euphol + tirucallol.

C5: présence de 30% de lupéol.

Type D: cycloarténo1 + méthylène-24 cycloartanol + lupéol + euphol en quantités sensiblement égales; *Type E*: α-amyrine *sans* triterpènes tétracycliques.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

L'examen du tableau 3 conduit à deux remarques générales: d'une part l'isolement de la section *Poinsettia* et d'autre part la fréquence des groupes C et D, renfermant le cycloarténo1 et son compagnon le méthylène-24 cycloartanol qui avait été pourtant mentionné une seule fois antérieurement (tableau 1).

Section Poinsettia

Dans la classification de Pax, cette section contient quatre espèces; nous en avons étudié deux: leur latex contient environ cinq fois plus d'esters de triterpènes que de triterpènes libres,* alors que tous les autres latex étudiés renferment presque exclusivement des triterpènes libres. Le triterpène majeur est l'α-amyrine; *aucun* triterpène tétracyclique n'a été décelé et ceci distingue à nouveau ces deux latex de tous les autres.

Or les *Poinsettia* ont souvent été groupés en un genre à part à cause de leur inflorescence particulière.[33] Ainsi dans une révision récente de la famille des Euphorbiacées, Hurusawa mentionne *Poinsettia* comme un genre distinct au même titre que *Euphorbia sensu stricto*.[34]

Il nous est difficile de juger la valeur du critère que nous apportons: le seul point de référence est fourni par la famille des Apocynacées où l'on observe des variations importantes dans la proportion des triterpènes libres et estérifiés d'un genre à l'autre.[35] Notons enfin que les résultats d'électrophorèse de Moyer[4] ont également fait apparaître l'unité de la section *Poinsettia* tout en la distinguant nettement des autres.

---

* Il s'agit d'ailleurs du même mélange de triterpènes dans les deux fractions.

[33] M. H. Moon, *Baileya* **4**, 176 (1956).
[34] I. Hurusawa, *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo* **6**, 209 (1954).
[35] J. van Die, *Annales Bogoriensis* **2**, 1, 1955.

Section Tithymalus

Il s'agit ici d'un groupe beaucoup plus important d'espèces, en fait le plus important du genre. Nous en avons étudié 16 espèces, réparties dans 6 des 12 sous-sections de Pax. Toutes ces espèces contiennent en proportions variables les trois produits du type C1. L'euphol a pu être identifié en trace dans l'une d'elles. Deux espèces au moins (*E. helioscopia* et *E. cyparissias*) contiennent également le cycloartène-23 diol-3β,25, que nous n'avons pas recherché dans les autres latex.

Il n'est pas évident que l'homogénéïté apparente de ce groupe puisse être conservée après une analyse spéciale des triterpènes pentacycliques mineurs accompagnant les produits mentionnés.

Section Euphorbium

Nous avons examiné 52 espèces de cette section, réparties dans sept des onze sous-sections de Pax. L'hétérogénéïté de cette section se manifeste sur le plan chimique par la présence d'espèces dont les latex appartiennent aux cinq types A-E définis plus haut. Nous ne discuterons que les trois groupes représentés par un nombre suffisant d'espèces: les espèces coralliformes de la sous-section *Tirucalli*, les espèces épineuses de *Goniostema*, *Diacanthium* et *Anthacanta* et les espèces endémiques du Cap (*Medusea*).

Sous-section Tirucalli

Celle-ci comprend deux groupes d'espèces chimiquement distincts: quatre des espèces étudiés appartiennent au groupe C et six au groupe B.* Or le premier groupe est constitué d'espèces africaines alors que les six espèces du second groupe sont malgaches. En fait l'origine de *E. tirucalli* n'est pas connue de façon certaine: cette espèce est très répandue en Afrique et à Madagascar mais également dans le Sud et le Sud-Est asiatique. Néanmoins Madagascar est considéré comme le point de départ de cette dispersion.[36] A cette incertitude près, la sous-section *Tirucalli* se divise donc en espèces malgaches et espèces africaines. Nous allons tout de suite retrouver une division semblable.

Sous-sections Goniostema, Diacanthium, Anthacantha *et* Medusea

Les espèces épineuses africaines et malgaches forment une partie importante de notre étude puisqu'elles représentent la moitié des espèces étudiées, soit 4 *Goniostema* malgaches, 11 *Splendentens* également malgaches, 20 biaculées (*Trigonae* et *Polygonae*) africaines et indiennes et 2 *Anthacantha* d'Afrique du Sud.

A l'intérieur de la sous-section *Diacanthium* nous trouvons une distinction nette entre les *Splendentens* (type C3) et les *Trigonae* et *Polygonae* (Type A). Or les premières forment un groupe homogène du point de vue géographique (ce sont les "songo-songo" malgaches), morphologique[37, 38] et morphogénétique (elles possèdent bien des épines comme les *Polygonae* mais ces épines ont des origines différentes dans les deux cas).[39] D'après Croizat[37] les *Splendentens* auraient été isolées avant la séparation de Madagascar du continent africain. Ce groupe

* Le mélange euphol-tirucallol caractérise également *Synadenium grandtii* et *Elaeophorbia grandifolia*, Euphorbiacées africaines très proches de *Euphorbia* par leur morphologie florale mais plutôt apparentées à d'autres sections que *Tirucalli*.

[36] L. Croizat, *Webbia* **20**, 573 (1965).
[37] L. Croizat, *Candollea* **19**, 17 (1964).
[38] E. Ursch et J. Leandri, *Mem. Inst. Scient. Madagascar* **5**, 109 (1954).
[39] P. Boiteau, *Notulae System.* **13**, 154 (1947).

des *Splendentens* est d'ailleurs très proche des *Goniostema*, et Boiteau les réunit sur la base de l'origine des épines et du rapport phyllotaxique.[39] Sur le plan chimique nous trouvons des compositions identiques (type C3) qui autorisent une réunion des deux groupes, réunion qu'acceptent Ursch et Léandri.[38]

Après avoir rappelé (par des critères morphologiques) et confirmé (par des résultats chimiques) que le groupage sous le nom générique d'"espèces épineuses" est abusif et dépourvu de signification phylétique, nous essaierons de trouver des données botaniques concordant avec nos résultats chimiques.

Nous laisserons de côté les deux espèces nord-africaines *E. echinus* et *E. officinarum* que, ni leur morphologie, ni leur origine géographique, ne distinguent des autres *Polygonae* mais qui sont de type D alors que les autres sont type A. Nous n'avons pas pu obtenir d'explication à cette exception.

Il reste donc quatre groupes distincts: "Songo-songo" (C3); *Anthacantha* (C4); *Medusea* (C5); *Trigonae* et *Polygonae* (A).

Ces quatre groupes concordent avec ceux qu'a établis Croizat[36] sur la base de la localisation de leurs ancêtres respectifs à l'époque du Crétacé ancien: après séparation et isolement, l'un se serait développé à Madagascar en donnant naissance au premier groupe, le deuxième en Afrique du Sud, le troisième plus particulièrement dans la région du Cap et le dernier se serait étendu à partir de l'Afrique Centrale sur tout le continent africain et en Inde. Ainsi le couple euphol-euphorbol aurait été associé à une morphologie particulière à une époque et à un endroit donnés, et l'aurait accompagnée au cours de sa dispersion géographique. La signification phylétique de ces deux produits "anormaux" est donc reliée à un facteur géologique et biogéographique indépendant d'une éventuelle adaptation chimique actuelle à l'écologie et au climat.

CONCLUSION

Nous sommes évidemment conscients des limites de notre argumentation étant donné le caractère partiel et provisoire de nos résultats.

Les conclusions auxquelles nous conduit l'examen de 75 espèces sont les suivantes: (1) Les techniques mises au point permettent l'analyse des triterpènes de nombreuses espèces avec des échantillons minimes; (2) L'euphol, considéré comme caractéristique des Euphorbes, n'est le constituant principal du latex que dans un nombre limité d'espèces; (3) Il est associé au tirucallol dans les espèces coralliformes malgaches (*Tirucalli*) et deux genres voisins (*Synadenium* et *Elaeophorbia*); (4) Il est associé à l'euphorbol dans les *Polygonae* et les *Trigonae*; (5) Le cycloarténol et le méthylène-24 cycloartanol sont présents dans au moins une partie des espèces de toutes les sections étudiées, sauf *Poinsettia*. Ils sont les triterpènes majeurs des *Anisophyllum*, *Adenopetalum*, *Pseudeuphorbium* et *Tithymalus* étudiés, ainsi que d'un certain nombre d'*Euphorbium*; (6) La section *Poinsettia* se distingue chimiquement de toutes les autres par l'absence de triterpènes tétracycliques, et la présence d'esters d'α-amyrine. Rien ne s'opposerait, sur le plan chimique, à une séparation de cette section; (7) Les résultats chimiques permettent de rassembler les espèces en groupes homogènes dont l'unité phylogénétique a été démontrée par Croizat dans une récente étude du genre;[36] il est pour le moins frappant de voir ainsi converger des discussions fondées sur la phytogéographie et sur la chimie.

Un complément de cette étude pourrait être réalisé par l'examen du genre *Monadenium* qui, localisé en Afrique Orientale, fournirait sans doute des arguments à la discussion ci-dessus.

Il est évident d'autre part que les sections *Anisophyllum*, *Adenopetalum* et *Poinsettia*, ainsi que le genre *Pedilanthus*, largement répandus en Amérique. pourraient être l'objet d'une étude semblable.

Remerciements—Outre les responsables des services déjà mentionnés, nous tenons à remercier pour leur aide dans la collection d'échantillons M. Garnier, le Professeur Braun et les services de l'O.R.S.T.O.M. (Côte d'Ivoire), M. Degras (Guadeloupe), le Professeur Charles (Cameroun) et le Dr. Breton (Espagne).

Nous remercions également M. Sell (Institut de Botanique, Strasbourg) pour les identifications d'espèces, et enfin et surtout le Professeur Léandri (Muséum d'Histoire Naturelle, Paris) et le Dr. Croizat (Caracas, Venezuela) pour leurs nombreux conseils.

C H A P I T R E V

BIOSYNTHÈSE *in vitro* DES TRITERPÈNES DANS LE LATEX D'*Euphorbia*

BIOSYNTHÈSE *IN VITRO* DES TRITERPÈNES DANS LE LATEX D'*EUPHORBIA**

GÉRARD PONSINET et GUY OURISSON

Laboratoire associé au C.N.R.S., Institut de Chimie, Esplanade, Strasbourg, France

(*Received* 22 *February* 1967)

Résumé—L'activité enzymatique du latex d'Euphorbe est mise en évidence par la transformation *in vitro* d'acétate 1-^{14}C en triterpènes (euphol, euphorbol, lanostérol, cycloarténol, méthylène-24 cycloartanol, cycloartène-23 diol-3β, 25) dans des latex de différentes espèces. L'influence de différents facteurs est étudiée et discutée.

Abstract—The enzymatic activity of the latex of various *Euphorbia* species is demonstrated by the transformation *in vitro* of labelled acetate into triterpenes (euphol, euphorbol, lanosterol, cycloartenol, 24-methylene-cycloartanol, cycloart-23-ene-3β, 25-diol). Various conditions of incubation are studied and discussed.

INTRODUCTION

LE LATEX des espèces du genre *Euphorbia* est caractérisé par un certain nombre de triterpènes. tétracycliques dont nous avons étudié systématiquement la répartition dans un but taxonomique.[1]

D'autre part, les travaux effectués sur d'autres latex ont indiqué que ces milieux avaient une activité enzymatique propre qui les rendait capables de synthétiser des produits secondaires même *in vitro*: caoutchouc dans le latex de *Hevea brasiliensis* Muell., à partir d'acétate,[2] de mévalonate[3] et de pyrophosphate d'isopenténylе;[4] et morphine dans le latex de *Papaver somniferum* L. à partir de tyrosine.[5, 6]

La connaissance biochimique de ces milieux végétaux particuliers que sont les latex a d'ailleurs profité ces dernières années des nombreuses recherches entreprises par différents groupes en vue d'améliorer la productivité de l'arbre à caoutchouc. Ces études ont mis en particulier en évidence la complexité biochimique et cytologique de ce système qui avait été longtemps considéré comme un suc vacuolaire.

Tous les résultats relatifs à *Hevea* ne sont certes pas applicables *a priori* dans le détail aux autres latex. En fait les récents travaux de Meissner[7] sur des latex d'espèces de différentes familles ne font apparaître que des variations faibles de certaines caractéristiques (valeur du pH,[7a] teneur en protéines et ARN,[7b] importance des échanges gazeux).[7c]

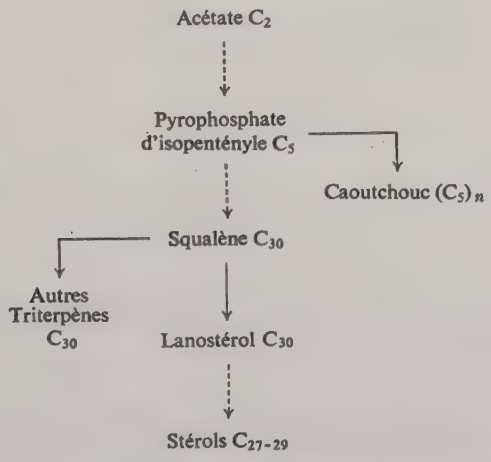
Nos propres résultats, mentionnés ci-dessous, permettent de mettre en évidence la biosynthèse des triterpènes d'*Euphorbia* par incubation *in vitro* de latex en présence de précurseurs radioactifs (acétate 1-^{14}C et mévalonate 2-^{14}C).

---

[1] G. PONSINET et G. OURISSON, (chap. IV)
[2] H. J. TEAS et R. S. BANDURKSI, *Plant Physiol*, **32**, 643 (1957).
[3] R. G. O. KEKWICK et B. L. ARCHER, *Nature* **184**, 268 (1959).
[4] F. LYNEN et U. HENNING, *Angew. Chem.* **72**, 820 (1960).
[5] G. KLEINSCHMIDT et K. MOTHES, *Arch. Phyt.* **10**, 293 (1960).
[6] J. W. FAIRBAIRN et G. WASSEL, *Phytochem.* **3**, 583 (1964).
[7a] L. MEISSNER, *Flora, Abt. A.* **156**, 404 (1966); [b] **156**, 634 (1966); [c] **157**, 1 (1966).

La grande variété des triterpènes tétra-et pentacycliques rencontrés dans le latex de différentes Euphorbes rend ce milieu particulièrement intéressant pour l'étude de la cyclisation du squalène: la connaissance du mécanisme de cette cyclisation pourra peut-être placer sur une base plus fondamentale les résultats chimiotaxonomiques mentionnés ci-dessus.[1]

Sur l'ensemble des travaux réalisés sur la biosynthèse des stérols, peu se sont attachés à étudier la cyclisation du squalène en la dissociant des autres étapes conduisant de l'acétate aux stérols.



Le latex au contraire est caractérisé par sa forte teneur en triterpènes alors qu'il est très pauvre en stérols par comparaison avec d'autres systèmes (Tableau 1).

TABLEAU 1

Système	Rapport en poids $\frac{\text{triterpènes}}{\text{stérols}}$	Référence
Levure	0,02	9
Insaponifiable d'huiles de graines variées	0,01–0,1	10
Tissu de tabac cultivé *in vitro*	0,15	14a
Pois en germination (*Pisum sativum* L.)	0,22	11
Foie de rat	1	12
Euphorbe (plante entière)	5	
Euphorbe (latex isolé)	40	

Signalons également que l'accumulation de caoutchouc, réaction secondaire de la synthèse terpénique, est très faible chez les Euphorbes.[8]

[8] D. E. BERNAL, *Rev. Gén. Caoutchouc.* **32**, 889 (1955).
[9] G. PONSINET, Résultats non publiés.
[10] E. FEDELI, A. LANZANI, P. CAPELLA et G. JACINI, *J. Am. Oil Chemists Ass.* **43**, 254 (1966).
[11] D. J. BAISTED, E. CAPSTACK et W. R. NES, *Biochemistry* **1**, 537 (1962).
[12] P. B. SCHNEIDER, R. B. CLAYTON et K. BLOCH, *J. Biol. Chem.* **224**, 175 (1957).
[13] G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* **4**, 799 (1965).

Enfin, le latex-milieu enzymatique acellulaire-devrait mieux qu'un tissu animal ou végétal permettre de contrôler la pénétration des précurseurs et l'homogénéité du milieu, l'homogénéisation des tissus ne préservant pas toujours toute leur activité enzymatique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Obtention du Latex

La plus grande partie des opérations mentionnées ci-dessous a été effectuée sur des latex d'espèces herbacées récoltées au Jardin Botanique de Strasbourg ou en végétation spontanée dans la campagne environnante, de juillet à octobre.

Deux espèces herbacées contenant du cycloarténol et du méthylène-24 cycloartanol ont été choisies pour leur abondance locale (*E. helioscopia* L. et *E. cyparissias* L.); une troisième espèce cactiforme (*E. erythreae* L.) a été utilisée pour mettre en évidence la biosynthèse de l'euphol et de l'euphorbol.

Le stockage des plantes n'a jamais dépassé 24 hr avant la collecte du latex. Celle-ci s'effectue pour les espèces herbacées en coupant les tiges une à une à quelques cm du sommet; le latex est collecté dans un tube maintenu à 0° par de la glace. Avec les plantes utilisées, la collecte de 1 ml de latex exige en moyenne 10 min de travail. Le latex d'*E. erythreae* L. est récolté par saignée avec une lame de rasoir, et pipettage.

Incubations

Pour chaque série d'incubations, le latex ainsi obtenu est réparti dans des tubes contenant précurseur, tampon et additifs éventuels. L'acétate de sodium est ajouté en solution dans l'eau (10 μC dans 0,1 ml d'eau pour 1 ml de latex). Chaque incubation est faite à température ambiante à l'abri de la lumière et sur un volume de 0,5–1 ml de latex. La plupart des valeurs d'activité mentionnées sur les courbes et tableaux ci-dessous sont les moyennes de deux incubations identiques.

Les incubations ne sont pas faites dans des conditions stériles, les plantes étant simplement lavées à l'eau avant traitement. Ce fait ne devrait pas présenter d'inconvénients étant données les faibles durées d'incubations.

Le latex des Euphorbes utilisées contient à peu près 10% de matière sèche. Le quart de cette matière sèche est constitué de triterpènes sous forme libre (3βOH). Chaque ml de latex contient donc 25 mg de triterpènes environ.

MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ DU LATEX *IN VITRO*

Les premiers essais d'incorporation destinés à mettre au point les conditions d'incubation et la méthode d'extraction ont été effectués par simple mélange de latex et d'acétate de sodium en solution aqueuse. Chacune des trois espèces mentionnées ci-dessus a ainsi fourni des fractions triterpéniques radioactives, dont les constituants ont été séparés sous forme d'époxy-des-acétates suivant une méthode déjà décrite.[13] Des recristallisations répétées montrent que l'activité spécifique de ces produits est constante (Tableau 2).

La biosynthèse du lanostérol à partir d'acétate a été étudiée dans de nombreux systèmes, celle du cycloarténol et du méthylène-24 cycloartanol a été mise en évidence dans les tissus de tabac cultivés *in vitro*[14] et les feuilles de *Pisum sativum* L.;[15] celle de l'euphol et de l'euphorbol, caractéristiques des Euphorbiacées, n'avait pas été mentionnée jusqu'ici..

[14a] P. Benvéniste, L. Hirth et G. Ourisson, *Phytochem.* **5**, 31 (1966); [b] J. D. Ehrhardt, L. Hirth et G. Ourisson, *Phytochem.* **6**, 815 (1967); [c] W. W. Reid et M. J. Bernard, *Biochem. J.* **100**, 13P (1966).

[15] L. J. Goad et T. W. Goodwin, *Biochem. J.* **99**, 735 (1966).

TABLEAU 2. ACTIVITÉ EN CPM/MG DES ÉPOXYDES-ACÉTATES DE TRITERPÈNES

Nombre de recristallisations	*E. Cyparissias* L.*		*E. helioscopia* L.†			*E. erythreae* L.†	
	Méthylène-24 cycloartanol	Cyclo-arténol	Méthylène-24 cycloartanol	Cyclo-arténol	Lanostérol‡	Euphol	Euphorbol
1	47	20	1200	566	133	239	90
2	46	13	1143	493	130	195	65
3	44	15	1098	502	138	205	77
4	44	13	1095	503	140	195	75
5	45	14	1131	512			
6			1078				

* Activités mesurées au compteur à coupelles Nuclear Chicago.
† Activités mesurées au compteur à scintillations Packard.
‡ De tous les produits mentionnés ci-dessus, seul le lanostérol est présent en trop faible quantité et la recristallisation de son époxyde acétate nécessite l'addition préalable d'entraineur non-radioactif.

Le cycloartène-23 diol-3β, 25, dont la présence dans *E. cyparissias* L. a été indiquée récemment,[16] a également été obtenu sous forme radioactive dans le latex de *E. helioscopia* L. Ce produit est présent sous forme estérifiée alors que les triterpènes 3β-hydroxylés sont sous forme libre.

Les Figs. 1 et 2 qui représentent la variation dans le temps des produits de la synthèse terpénique dans le latex, confirment que les triterpènes y sont bien des produits d'accumulation et que la synthèse des stérols y est négligeable.

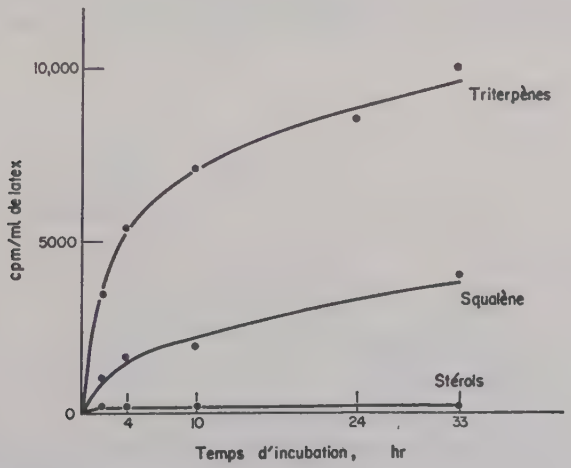


FIG. 1. ACCUMULATION DES TRITERPÈNES À PARTIR D'ACÉTATE.

Latex *E. helioscopia* L. Incubation de 0,5 ml de latex avec 5 μc d'acétate.

[16] A. N. STARRAT, *Phytochem.* **5**, 1341 (1966).

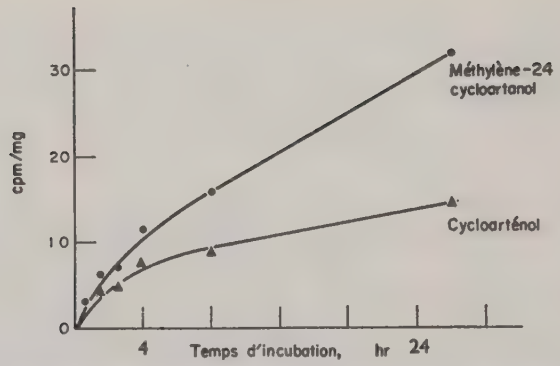


FIG. 2. ACCUMULATION DE MÉTHYLÈNE-24 CYCLOARTANOL ET DE CYCLOARTÉNOL.
Latex d'*E. cyparissias* L. Incubation de 1 ml de latex avec 10 μc d'acétate. Compteur Nuclear Chicago.

ÉTUDE DES CONDITIONS D'INCUBATION

J. d'Auzac *et al.*[17] ont montré que le rendement de l'incorporation de l'acétate en caoutchouc dans le latex d'*Hevea* était très sensible aux modifications physiques (pH, température, pression osmotique, dilution, etc. ...). Il semble en fait, d'après les résultats ci-dessous, que les variations d'activité en fonction de différents facteurs soient comparables à celles observées dans d'autres systèmes (homogénat de foie en particulier).

Pour étudier l'influence de différents facteurs sur le rendement de la synthèse des triterpènes, il n'est pas nécessaire de séparer le cycloarténol et le méthylène-24 cycloartanol qui en sont les constituants majeurs: l'activité spécifique de leur mélange en cpm/mg donne une bonne mesure de l'activité enzymatique par unité de volume de latex, mesure indépendante des pertes possibles à l'extraction et ne nécessitant pas l'introduction préalable d'entraîneur.

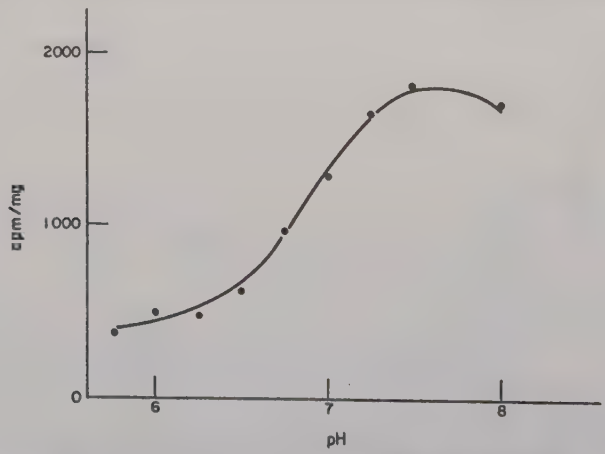


FIG. 3. INFLUENCE DU pH SUR LA SYNTHÈSE DES TRITERPÈNES.
Latex de *E. helioscopia* L. Incubation (24 hr) de 0,5 ml de latex; 0,5 ml de tampon phosphate 0,1 M; 5 μc acétate.

[17] J. D'AUZAC, S. PUJARNISCLE, P. L. E. FOURNIER et T. C. CUONG, *Ann. Fac. Sci. Univ. Saigon* 97 (1962).

Influence du pH

Le pH du latex de différentes espèces d'Euphorbes a été déterminé récemment [7a] et varie de 5,4–6,3 suivant les espèces. Néanmoins, la dilution du latex par un volume égal de tampon phosphate 0,1 M de pH déterminé montre que le pH naturel ne correspond pas au maximum d'activité (Fig. 3).

Influence de la Pression Osmotique

La Fig. 4 montre l'influence de la pression osmotique du tampon de dilution, faisant apparaître un maximum pour une concentration de saccharose d'environ 0,5 M.

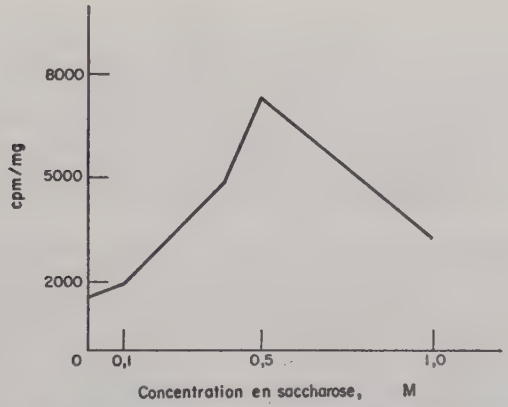


FIG. 4. INFLUENCE DE LA PRESSION OSMOTIQUE SUR LA SYNTHÈSE DES TRITERPÈNES.
Latex de *E. helioscopia* L. Incubations (24 hr) de: 0,5 ml de latex; 0,5 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4; 5 μc acétate.

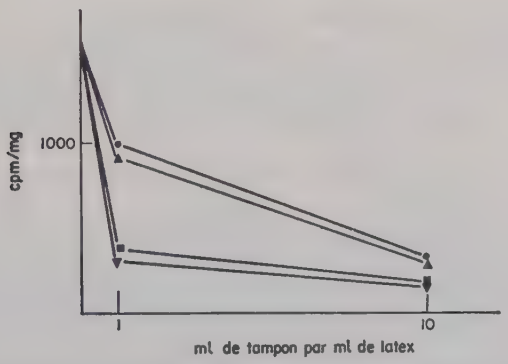


FIG. 5. INFLUENCE DE LA DILUTION ET DES COFACTEURS.
Latex de *E. helioscopia* L. Incubations (24 hr) de 0,5 ml de latex; 0,5 à 5 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4; 5 μc acétate.
● tampon seul; ▲ tampon + $MgCl_2$; ■ tampon + cofacteurs* + saccharose 0,4 M; ▼ tampon + cofacteurs.
* NADH 0,5μ M/ml; ATP 0,6 μM/ml; $MgCl_2$ 0,004 M; EDTA 10 μM/ml; GSH 0,01 M; Nicotinamide 0,03 M.

Influence des Cofacteurs

D'après les courbes de la Fig. 5, il apparaît que le latex doit contenir les quantités optimales des cofacteurs et additifs utilisés habituellement pour renforcer l'activité des enzymes extraits dans les homogénats de tissus puisque, globalement, leur addition abaisse le rendement de l'incorporation d'acétate.

La détermination de la concentration optimale de chacun de ces additifs nécessiterait de très nombreuses mesures. Il a été montré récemment [18] que la concentration optimale d'ATP pour l'incorporation d'acétate en caoutchouc et lipides dans le latex d'*Hevea* est de 0,1 μM/ml, des concentrations plus élevées étant inhibitrices.

La Fig. 5 montre par ailleurs la forte diminution d'activité due à la dilution par le tampon utilisé.

ESSAI DE FRACTIONNEMENT DU LATEX

Plusieurs études de la biosynthèse des stérols dans les homogénats de tissu ont montré que cette synthèse à partir d'acétate se fait jusqu'au pyrophosphate de farnésyle par des enzymes solubles, et de ce produit aux triterpènes au niveau des microsomes.[19] Ces microsomes sont une fraction de centrifugation à haute vitesse contenant les débris du réticulum endoplasmique, fragmenté lors de l'homogénéisation. Ils contiennent des fragments lipoprotéiques et les ribosomes.

Le Tableau 3 montre, par comparaison des rendements d'incorporation d'acétate et de mévalonate, que l'étape lente de la synthèse des triterpènes dans le latex se situe après le mévalonate. D'autre part, la centrifugation à basse vitesse provoque l'élimination d'enzymes nécessaires à la transformation du mévalonate en triterpènes. La collecte du latex se faisant sans homogénéisation, il faut admettre que cette centrifugation élimine le réticulum endoplasmique et l'activité enzymatique qui lui est associée. La présence de ribosomes a été mise en évidence dans le latex de *Hevea brasiliensis* Muell. par McMullen [20] et dans celui de *Papaver somniferum* L. par Meissner [7a] mais on a également montré que ces particules sont associées en un réseau [21] qui provoque leur sédimentation à basse vitesse.[7a]

TABLEAU 3. LATEX *E. helioscopia* L.

Précurseur	Centrifugation avant incorporation de précurseur	Activité spécifique des triterpènes cpm/mg
5 μc acétate	—	680
5 μc acétate	15 min 2000 *g*	2
2 μc MVA	—	774
2 μc MVA	15 min 2000 *g*	3

Fractions de 0,5 ml de latex dilué par 1 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4.

Ainsi le latex ne se comporte pas comme un homogénat, qui conserve son activité après centrifugation à 10.000 *g*. Il faut noter de plus que la centrifugation du latex à 2000 *g* n'élimine

[18] G. WEEKS et R. G. O. KEKWICK, *Biochem. J.* **96**, 52P (1965).
[19] L. GOSSELIN et J. DUVIVIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 359 (1965).
[20] A. I. MCMULLEN, *Biochem. J.* **85**, 491 (1962).
[21] W. A. SOUTHORN, *Nature* **189**, 1000 (1961).

pratiquement pas de triterpènes: ceux-ci ne se séparent que partiellement à 40.000 *g*, en se collant à la paroi du tube au niveau supérieur du liquide.

ESSAI D'INCORPORATION DU SQUALÈNE

La transformation du squalène en triterpènes comprend une cyclisation et une hydroxylation. Un travail récent de Barton et Moss [22] semble montrer que les deux réactions ne sont pas concertées puisque ces auteurs ont montré que le lanostadiène est un précurseur du lanostérol dans la levure. Deux autres groupes ont par ailleurs montré que l'oxydation peut précéder la cyclisation, en réalisant la transformation de l'époxy-2,3 squalène en lanostérol [23] par les enzymes du foie de rat.

Les microsomes sont connus comme étant le support des hydroxylases, ce qui expliquerait leur rôle dans l'hydroxylation. Ils pourraient avoir également pour rôle de fournir une surface stéréospécifiquement active qui imposerait au squalène—hydrocarbure acyclique et insoluble dans l'eau—une conformation permettant la cyclisation par réaction de diènes 1–5. Suivant les espèces, cette surface active imposerait une conformation conduisant au cycloarténol ou à l'euphol. Nos résultats relatifs à la centrifugation du latex confirment que les microsomes, ou du moins la structure qui les produit, sont nécessaires à cette synthèse.

Dans le but de localiser plus précisément le site de cyclisation du squalène nous avons tenté d'incorporer du squalène radioactif au latex. Cet hydrocarbure étant insoluble dans l'eau nous avons dû le disperser dans un tampon à l'aide de Tween 20 ou d'acétone, les concentrations en ces produits étant déterminées pour produire une dispersion efficace sans pour cela inhiber l'activité enzymatique.

Malgré ces précautions, aucune radioactivité n'a pu être décelée dans les triterpènes après incubation de latex en présence de squalène, dans des conditions où l'acétate se transforme en triterpènes.

CONCLUSION

La mise en évidence de l'activité enzymatique du latex *in vitro* confirme que celui-ci a bien le caractère d'un cytoplasme physiologiquement actif. Ce latex constitue un système à la fois facilement accessible et plus proche du milieu cellulaire que les homogénats de tissus, puisque la méthode de récolte permet d'en préserver les structures.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Extraction des Triterpènes

Après incubation pendant 24–48 hr, le latex est lyophilisé et extrait à éther de pétrole. La solution obtenue est filtrée sur coton, Na_2SO_4 anhydre et Al_2O_3. La colonne d'alumine est éluée au mélange EP-éther 50/50 et le produit obtenu fractionné sur chromatoplaque préparative de SiO_2. Les triterpènes libres sont récupéré et acétylés (12 hr à température ordinaire dans la pyridine anhydre en présence de Ac_2O).

Les acétates de triterpènes ainsi obtenus sont filtrés sur une colonne de SiO_2-$AgNO_3$ 90/10 éluée au mélange éther de pétrole-éther 80/20 ou mieux sur une plaque préparative de SiO_2-$AgNO_3$. L'acétylation suivie de chromatographie sur $AgNO_3$ assure une purification supplémentaire des produits radioactifs.

Le produit obtenu est éventuellement époxydé pour en séparer les constituants par chromatoplaques préparatives de SiO_2. Dans la plupart des cas, ces acétates de triterpènes ont été comptés directement dans un compteur à scintillations Packard sur des quantités allant de 0 à 5 mg.

---

[22] D. H. R. Barton et G. P. Moss, *Chem. Commun.* 261 (1966).

[23] E. J. Corey, W. E. Russey et P. R. O. de Montenallo, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4750 (1966); E. E. Van Tamelen, J. D. Willett, R. B. Clayton et K. E. Lord, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4752 (1966).

La quantité de triterpènes présents préalablement dans le latex (20–40 mg par ml de latex suivant les espèces) rend inutile l'addition d'entraîneur. Par contre, pour tracer les courbes de la Fig. 1, il est nécessaire d'ajouter du squalène non radioactif, celui-ci n'étant pas pondéralement présent, et du β-sitostérol non radioactif, dont le latex contient environ 1 mg par ml.

Préparation du Squalène Radioactif

Du squalène à haute activité spécifique a été préparé par germination de pois (*Pisum sativum* L.) en présence d'acétate de sodium 1-^{14}C selon la méthode décrite par Capstack *et al.*[24] Le marquage du squalène obtenu a été vérifié sur une fraction aliquote par recristallisation de son hexachlorure après addition d'hexachlorure de squalène non radioactif (Tableau 4).

TABLEAU 4. RECRISTALLISATION DE L'HEXACHLORURE DE SQUALÈNE RADIOACTIF PRODUIT PAR LE POIS

Recristallisation	F°	Activité spécifique cpm/mg
1		540
2		538
3		536
4		550
5		580
6	128–134	580
7	129–135	560

Analyse des Stérols

L'analyse de la fraction stérolique du latex en chromatographie en phase gazeuse montre qu'elle est essentiellement constituée de β-sitostérol accompagné de cholestérol (8%) et de campestérol (5%) (Tableau 5).

TABLEAU 5. TEMPS DE RÉTENTION DES STÉROLS PAR RAPPORT AU CHOLESTANE (8,9 MIN)

	3 β OH	3 β OAc
Cholestérol	2,2	3,0
Campestérol	2,7	3,9
β-Sitostérol	3,4	4,8

Appareil Pan Chromatograph PYE; Colonne 0,75% SE 52; Température 240°.

Remerciements—Nous remercions les Drs. P. Benveniste et J. D. Ehrhardt pour leur aide et leurs conseils et le Professeur L. Hirth (Centre de Recherches Nucléaires, Strasbourg) chez qui ont été faits les comptages de radioactivité.

[24] E. CAPSTACK, D. J. BAISTED, W. W. NEWSCHWANDER, G. BLONDIN, N. L. ROSIN et W. R. NES, *Biochemistry* **1**, 1179 (1962).

C H A P I T R E V I

ASPECTS PARTICULIERS DE LA BIOSYNTHÈSE DES TRITERPÈNES DANS LE LATEX D'EUPHORBIA

RÉSUMÉ

L'utilisation du latex d'*Euphorbia in vitro* comme milieu d'étude de la biosynthèse des triterpènes a permis de mettre en évidence les faits suivants :

1 - l'époxyde de squalène peut être considéré comme un intermédiaire de cette synthèse dans ce milieu ;

2 - la fraction particulaire, sédimentable à basse vitesse, indispensable à la cyclisation du squalène est effectivement responsable de l'orientation stérique donnée à cette réaction ;

3 - la biosynthèse des triterpènes se fait indépendamment dans le latex et dans les tissus de la plante ;

4 - le lanostérol présent dans le latex de certaines Euphorbes est, contrairement à celui des tissus animaux, un produit dérivé du cycloarténol.

Une interprétation de la variabilité de la composition des latex d'Euphorbes en triterpènes peut être tirée de ces résultats.

Dans une étude préliminaire (1) nous avions montré l'aptitude du latex d'Euphorbia à synthétiser in vitro les triterpènes à partir d'acétate $CH_3-{}^{14}CO_2Na$.

Nous avons mis à profit cette propriété pour obtenir quelques résultats complémentaires résumés ci-dessus.

A/ INTERMÉDIAIRES DE LA CYCLISATION DU SQUALÈNE EN TRITERPÈNES

Depuis que le rôle de l'époxyde de squalène comme intermédiaire de la cyclisation du squalène en lanostérol a été mis en évidence dans le foie de rat (2,3), ce produit a été trouvé également dans deux systèmes végétaux : il a été cyclisé en β-amyrine par un homogénat de pois en germination (4) et il est présent dans les tissus de tabac cultivés in vitro, où il doit être un précurseur du cycloarténol (5). Par contre, dans ce dernier milieu, aucune radioactivité n'a été décelée au niveau du cycloartène. On sait en effet que Barton et Moss (6) ont établi que le lanostadiène est un précurseur du lanostérol dans la levure.

---

(1) G. PONSINET et G. OURISSON, Phytochemistry, 6, 1235 (1967).

(2) E.E. VAN TAMELEN, J.D. WILLETT, R.B. CLAYTON et K.E. LORD, J.Amer.Chem. Soc., 88, 4752 (1966).

(3) E.J. COREY, W.E. RUSSEY et P.R.O. de MONTENALLO, J.Amer.Chem.Soc., 88, 4750 (1966).

(4) E.J. COREY, P.R.O. de MONTENALLO, J.Amer.Chem.Soc., 89, 3362 (1967).

(5) P. BENVENISTE et R.A. MASSY-WESTROPP, Tetrahedron Letters, 37,3553 (1967).

(6) D.H.R. BARTON et G.P. MOSS, Chem.Comm., 261 (1966).

Nous-mêmes avons cherché dans l'extrait de latex, après incubation avec de l'acétate 1-^{14}C, la radio-activité au niveau de ces deux produits : époxyde de squalène et cycloartène. Nos résultats indiquent que le premier de ces deux intermédiaires postulés est effectivement synthétisé dans le latex alors que l'activité du second y est négligeable. Ceci fournit donc un élément supplémentaire pour généraliser la voie de l'époxyde de squalène chez les végétaux supérieurs.

B/ LOCALISATION DU SITE DE CYCLISATION DU SQUALÈNE

ACTIVITÉ DU LATEX CENTRIFUGÉ

Nous avions montré que le latex centrifugé à basse vitesse (5000 g) (1) perd toute aptitude à synthétiser les triterpènes. Nous complétons ce résultat en indiquant (Tableau 1) que le surnageant est également incapable de synthétiser le farnésol libre et le squalène.

On sait que le pyrophosphate de farnésyle est synthétisé par les enzymes solubles et que sa dimérisation se fait au niveau d'une surface particulaire (microsomes de l'homogénat de foie de rat, par exemple). Ainsi la centrifugation du latex élimine des particules qui sont nécessaires à la synthèse du squalène.

Quant au farnésol libre il est libéré du pyrophosphate par des phosphatases qui, elles aussi, sont microsomales, ce qui explique son absence du surnageant.

LOCALISATION DES PRODUITS DE LA SYNTHÈSE TERPÉNIQUE

La centrifugation du latex après incubation avec de l'acétate 1-^{14}C permet d'extraire séparément le culot et le surnageant et de déterminer la radio-activité des produits qui s'y trouvent.

Nous constatons avec le Tableau 2 que la presque totalité des triterpènes synthétisés est localisée dans le culot. Puisque, pondéralement, les triterpènes sont présents dans le surnageant, il faut admettre qu'ils restent associés à la surface particulaire où ils sont synthétisés, plus de 24 h. avant d'être dispersés dans le surnageant. Cette forme de dispersion reste d'ailleurs à déterminer.

TABLEAU 1

Produits synthétisés	Latex entier (2 ml)	$S_{5000\ g}$ de 2 ml de latex
farnésol libre	1 400	100
squalène	400	20
triterpènes	19 000	300

Radioactivité des produits de la synthèse terpénique dans le latex de E. Cyparissias (cpm)

TABLEAU 2

Produits synthétisés	Temps d'incubation			
	12 h.		24 h.	
	Culot	Surnageant	Culot	Surnageant
farnésol libre	2 700	1 500	1 700	1 500
squalène	80	400	50	700
triterpènes	6 000	500	1 200	700

Radioactivité des produits localisés dans le culot et le surnageant de centrifugation après incubation avec acétate (latex de E. Cyparissias, 2 ml) (cpm)

TABLEAU 3

Produits synthétisés / Milieu d'incubation	Activité des triterpènes (cpm)	
	Méthylène-24 cycloartanol + cycloarténol	Euphol + Euphorbol
Surnageant E.erythreae + culot E.cyparissias	5 720	1 000
Surnageant E.cyparissias + culot E.erythreae	480	3 120

Nature des triterpènes synthétisés par des systèmes mixtes de latex

La faible activité du squalène présent dans le culot indique que ce produit y a un renouvellement rapide. Par contre, tout se passe comme si le squalène "dissocié" de ces membranes et présent dans le surnageant s'y accumule sans pouvoir être cyclisé.

SYSTÈMES MIXTES

Nous avons voulu ensuite vérifier que les particules qui constituent notre culot de centrifugation et qui sont le site de la cyclisation du squalène sont bien responsables de l'orientation stérique donnée à cette réaction. La cyclisation du squalène dans le latex conduit à une grande variété de produits dont nous avons montré la signification phylétique (7).

Le culot du latex de E. cyparissias (espèce produisant du cycloarténol et du méthylène-24 cycloartanol) a été dispersé dans le surnageant du latex de E. erythreae (espèce produisant de l'euphol et de l'euphorbol) et vice versa le culot de E.erythreae dans le surnageant de E.cyparissias. Le Tableau 3 montre que le premier mélange, riche en euphol et euphorbol endogènes, incubé avec de l'acétate 1-^{14}C a synthétisé du cycloarténol radio-actif et que le deuxième a synthétisé de l'euphol.

Ce résultat permet de confirmer le rôle des surfaces particulaires dans la cyclisation du squalène. Il faut également noter que, en poids de matière sèche, le culot ne représente qu'environ 2 % du poids total du latex. Nous n'avons pas pu trouver dans la littérature de données de cytologie définissant la nature des particules du culot.

C/ COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ DU LATEX ISOLÉ ET DES TISSUS DE LA PLANTE

Pour montrer que le latex constitue dans la plante un système particulier nous avons fait des incorporations d'acétate séparément dans le latex in vitro et dans les tissus de la plante où le latex a été prélevé.

Cette expérience a été réalisée avec E.erythreae (latex à euphol et euphorbol) et E.lathyris (latex à lanostérol, cycloarténol et méthylène-24

---

(7) G. PONSINET et G. OURISSON, Phytochemistry, sous presse (chapitre IV)

cycloartanol). Pour cette dernière espèce les feuilles ont simplement été immergées dans une solution d'acétate radio-actif ; pour la première, qui est une espèce cactiforme sans feuilles, des sections de tige ont été utilisées de la même façon.

Après l'incubation le latex et les tissus ont été extraits séparément. L'activité des stérols et celle de chacun des constituants triterpéniques a été mesurée.

Les Tableaux 4 et 5 rapportent les résultats obtenus. Ceux-ci confirment la très faible synthèse de stérols dans le latex isolé. Par contre, dans les deux cas, des stérols sont synthétisés par les tissus. Dans les deux cas également, les tissus synthétisent du cycloarténol en plus des triterpènes spécifiques du latex qu'ils contiennent encore : dans E.lathyris (Tableau 4) le rapport cycloarténol/lanostérol est plus élevé dans les tissus que dans le latex ; de même pour E.erythreae le rapport cycloarténol/euphol(Tableau 5)

Donc quels que soient les triterpènes (sans stérols) synthétisés par le latex (cycloarténol, lanostérol ou euphol) le couple cycloarténol-stérols est synthétisé par les tissus.

Ainsi les Euphorbes possèderaient deux systèmes distincts :
1 - le latex sans stérols mais contenant des triterpènes variés ;
2 - les tissus "normaux" qui comme tous les tissus des autres végétaux supérieurs étudiés contiennent du cycloarténol et des phytostérols (8).

Les Euphorbes à lanostérol et à euphol ne seraient donc des cas particuliers, parmi les plantes supérieures, qu'au niveau de leur latex.

D/ BIOSYNTHÈSE DU LANOSTÉROL DANS LE LATEX

Un certain nombre d'espèces d'Euphorbia sont connues pour contenir du lanostérol (7). Si l'expérience rapportée ci-dessus avec E.lathyris est généralisable aux autres Euphorbes à lanostérol, on peut affirmer que le lanostérol de ces plantes n'est synthétisé que par leur latex. Ces latex ont donc en commun avec les tissus animaux et ceux des levures la faculté de

(8) L.J. GOAD dans Terpenoids in Plants, Ed.J.B.Pridham, Academic Press, Londres 1967 ; J.D. EHRHARDT, Thèse Docteur-Ingénieur, Strasbourg 1967.

TABLEAU 4

Bilan de la synthèse terpénique dans E. lathyris

Produits synthétisés	Activité en cpm synthétisée par	
	les feuilles entières (1 g de poids sec)	le latex (1 ml)
Cycloarténol + méthylène-24 cycloartanol	64 000	35 000
lanostérol	19 050	19 000
stérols	6 800	0

TABLEAU 5

Bilan de la synthèse terpénique dans E.erythreae

Produit synthétisé	Activité en cpm synthétisée par	
	des sections de tiges (0,5 g de poids sec)	le latex (2 ml)
cycloarténol	10 400	1 100
euphol + euphorbol	32 000	32 000
stérols	3 300	500

synthétiser le lanostérol. Or on sait déjà que dans les tissus animaux et ceux des levures, le lanostérol est le précurseur des stérols alors que les latex sont dépourvus de stérols (Tableaux 4 et 5). Ceci constitue une première distinction.

L'expérience suivante va nous apporter une deuxième distinction relative à la biosynthèse de ce lanostérol. Le cycloarténol n'a jamais été mis en évidence dans un tissu animal ou dans une levure (où nous-mêmes l'avons d'ailleurs cherché (9)) alors qu'il coexiste dans les latex avec le lanostérol.

Nous avons profité de la synthèse de cycloarténol ^{14}C-25, réalisée par Murphy (10), pour incorporer ce produit au latex de E.lathyris. Nous avons pu mettre ainsi en évidence sa transformation en lanostérol radio-actif. Ce résultat a été obtenu par analyse au lecteur de chromatoplaques Berthold du mélange des époxydes-acétates de triterpènes (11) (Figure 1) et par recristallisation de l'époxyde-acétate de lanostéryle ainsi isolé (Tableau 6). Nous avons évidemment vérifié que la transformation observée est due à une réaction enzymatique : le cycloarténol, soumis au même traitement mais sans latex est récupéré intact. De plus, nous avons vérifié la localisation de l'isotope ^{14}C sur l'atome C_{25} du lanostérol biosynthétisé, pour exclure la possibilité d'une dégradation de la chaîne latérale du cycloarténol ^{14}C-25 conduisant à un produit radio-actif à bas poids moléculaire qui aurait pu se métaboliser en lanostérol. D'ailleurs :

1 - le rendement de la réaction (environ 2 %) est suffisamment bon et reproductible pour éliminer cette possibilité;

2 - la transformation de lanostérol ^{14}C-25 en cycloarténol n'a pas été observée dans les mêmes conditions;

3 - le cycloarténol ^{14}C-25 n'a pas pu être transformé en un autre triterpène dans les latex de E.cyparissias et E.erythreae .

Il semble donc que les latex à lanostérol présentent un cas de convergence avec les tissus animaux : un même produit, le lanostérol, y est présent mais sa biosynthèse et son catabolisme y semblent différents.

---

(9) G. PONSINET et G. OURISSON, Bull.Soc.Chim.France, 3682 (1965).

(10) C. MURPHY et G. OURISSON, travaux non publiés.

(11) G. PONSINET et G.OURISSON, Phytochemistry, 4, 799 (1965).

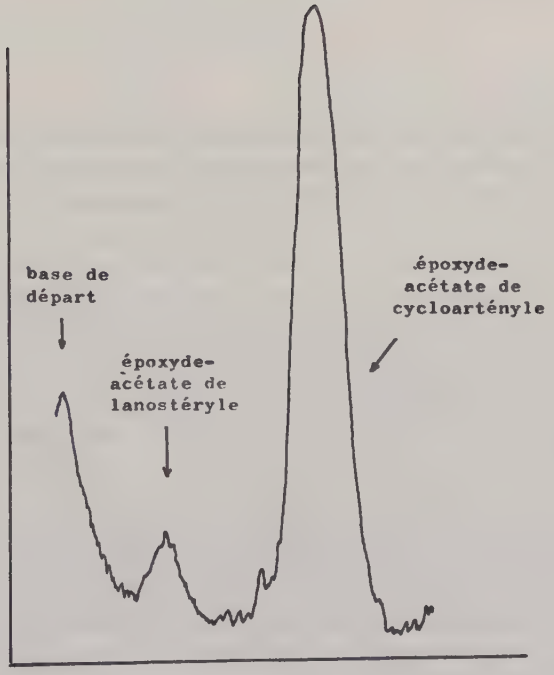


FIGURE 1

Diagramme de radioactivité des époxydes-acétates de triterpènes de E.lathyris après incorporation de cycloarténo1 25-^{14}C

TABLEAU 6

Recristallisation	Activité spécifique cpm/mg
1	130
2	115
3	120
4	132

Recristallisation de l'époxyde-acétate de lanostérol biosynthétisé à partir de cycloarténo1 25-^{14}C

CONCLUSION

Nous proposons l'interprétation suivante des résultats décrits ci-dessus et de ceux que nous avions décrits antérieurement dans une première étude chimiotaxonomique des latex du genre Euphorbia (7).

Les latex sont des systèmes particuliers, dont le rôle physiologique, quel qu'il soit, est assuré par la présence de grandes quantités de triterpènes en suspension. Ces triterpènes, intervenant en nature et non en tant qu'intermédiaire de la biosynthèse des phytostérols, des variations structurales sont compatibles avec la survie, et peuvent, si elles présentent un avantage même mineur, être sélectivement préservées dans des groupes plus ou moins étendus d'espèces.

En dehors du latex d'Euphorbia la littérature n'offre que deux cas de présence de lanostérol dans un végétal supérieur : l'huile de café (12) et le tissu de rose (13). Or une étude complémentaire et critique de ces deux cas a permis d'infirmer ces résultats (14). Le cycloarténol semble donc bien être le triterpène universellement répandu chez les végétaux chlorophylliens et le lanostérol celui des animaux et des champignons.

Etant donné l'absence de lanostérol dans les tissus animaux, la biosynthèse des phytostérols peut s'expliquer :

- soit par passage par le lanostérol, à condition que ce produit ait un renouvellement trop rapide pour être décelé
- soit par passage par le cycloarténol.

---

(12) H.P. KAUFMANN et A.K. SEN GUPTA, Fette Seifen, 66, 461 (1964).

(13) B.L. WILLIAMS et T.W. GOODWIN, Phytochemistry, 4, 81, (1965)

(14) L.J. GOAD, communication particulière.

Goad et Goodwin d'une part (15), Ben veniste et al. (16), Ehrhardt et al. (17) d'autre part, ont explicité cette hypothèse en présentant une voie métabolique vraisemblable reliant les produits effectivement trouvés dans leurs milieux d'étude respectifs.

Dans les latex également, le cycloarténol est le produit le plus généralement répandu puisqu'il est trouvé dans tous les groupes d'espèces d'Euphorbia. La présence de ce triterpène serait donc un caractère "primitif" que diverses mutations auraient pu modifier :

- apparition d'enzymes permettant des transformations du cycloarténol (cas des latex à lanostérol)
- modification de la stéréospécificité de la squalène-oxydocyclase conduisant aux triterpènes de la famille de l'euphol ou du tirucallol (cas de quelques groupes d'espèces cactiformes et de Hura crepitans (18))
- modification de la spécificité de la même enzyme, conduisant à des triterpènes pentacycliques partiellement estérifiés (cas du groupe Poinsettia)
- modification du système enzymatique avec polymérisation de la presque totalité du pyrophosphate d'isopentényle intermédiaire en caoutchouc (cas de Hevea). Il est d'ailleurs intéressant de noter que nous avons également mis en évidence la présence de traces de cycloarténol dans le latex d'Hevea.

---

(15) L.J. GOAD et T.W. GOODWIN, Europ.J.Biochem., 1, 357 (1967).

(16) P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, Phytochemistry, 5, 31 (1966).

(17) J.D. EHRHARDT, L. HIRTH et G. OURISSON, Phytochemistry, 6, 815 (1967).

(18) G. PONSINET et G. OURISSON, Phytochemistry, 4, 813 (1965).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les indications générales concernant la collecte du latex, le mode d'incubation, l'extraction, la purification et le comptage des triterpènes sont données dans la publication précédente (1).

Les valeurs chiffrées d'activité en cpm sont calculées en tenant compte de la quantité totale (endogène ou entraineur) des différents produits cherchés et sont donc indépendantes des pertes lors des extractions et purifications.

Mise en évidence de l'époxyde de squalène

Du latex de E.cyparissias (20 ml) est incubé 24 h in vitro avec 200 µC d'acétate 1-^{14}C. Après lyophilisation et extraction, on ajoute 30 mg d'époxyde de squalène et 30 mg de lanostène-8. L'insaponifiable est chromatographié sur plaque préparative de silice. La fraction correspondant au lanostène (et pouvant contenir également lanostadiène-8,24 et cycloartène-24) comptée sans autre purification, a une activité négligeable.

La fraction époxyde de squalène est rechromatographiée et traitée comme l'ont indiqué Benveniste et Massy-Westropp (5) : une partie est transformée en diol 2,3 et chromatographiée , et une partie de ce diol est transformée en monoacétate et chromatographiée.

Le comptage des trois produits indique une bonne constance de l'activité spécifique :

époxyde	158 cpm/mg
diol	162 cpm/mg
monoacétate	140 cpm/mg

ce qui est un critère suffisant de la pureté de la pureté de l'époxyde.

Caractérisation du farnésol libre

Pour déterminer l'activité du farnésol synthétisé dans le latex, du farnésol entraîneur est ajouté au moment de l'extraction. Par chromatographie sur plaque de silice, celui-ci est isolé puis acétylé. L'acétate obtenu est chromatographié sur plaque de silice, puis de silice imprégnée de nitrate d'argent. On obtient ainsi un produit débarassé d'éventuels acétates de stérols.

Centrifugation

Le latex est dilué par un égal volume de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 , saccharose 0,5 M.

La centrifugation est faite dans une centrifugeuse Serval à 5000 g pendant 10 mn à température ordinaire.

Pour redisperser un culot de centrifugation dans le surnageant le tube de centrifugeuse est agité par un Vibromixer pendant 1 mn.

Incorporation d'acétate aux tissus d'Euphorbes

Pour E.lathyris les feuilles sont immergées dans une solution aqueuse d'acétate $CH_3-{}^{14}CO_2Na$ (10 µC pour 5 g de feuilles). Après 24 h les feuilles sont lyophilisées, broyées et extraites à l'éther de pétrole. L'insaponifiable est chromatographié et les triterpènes et stérols sont séparés de la manière habituelle.

Pour E.erythreae des sections de tige d'environ 0,5 mm d'épaisseur sont immergées et traitées comme pour les feuilles ci-dessus.

Incorporation de cycloartenol 25-^{14}C au latex de E.lathyris

On ajoute 0,2 mg de Tween-20 à une solution éthérée de 500 000 cpm de cycloartenol 25-^{14}C fraîchement rechromatographié. L'éther est évaporé sous vide sans chauffer. Puis on ajoute 0,2 ml de tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,4 , 0,5 M sucrose et on agite le tube. A ce mélange on ajoute 1 ml de latex de E.lathyris aussitôt après sa collecte de la plante. Après 24 h d'incorporation le latex est lyophilisé et les triterpènes sont extraits, acétylés et époxydés de la manière habituelle.

On obtient un mélange (36 mg) d'époxydes-acétates de lanostérol, cycloartenol et méthylène-24 cycloartanol en quantités sensiblement égales.

Ce mélange est fractionné sur une plaque préparative éluée trois fois avec un mélange cyclohexane-acétate d'éthyle 95/5.

La répartition de la radio-activité sur la plaque est analysée par un lecteur de chromatogramme Berthold qui fournit le diagramme de la figure 1.

L'époxyde-acétate de lanostéryle est récupéré (10 mg, 8000 cpm) et rechromatographié deux fois sur plaque préparative avec un système d'élution très sélectif (plusieurs élutions successives). On y ajoute 40 mg du même produit non radio-actif et on recristallise quatre fois dans CH_2Cl_2-MeOH (F = 196-197° , litt. F = 194-198°(14)). Les cristaux obtenus à chaque cristallisation sont comptés au compteur à scintillation Packard (1 mg de cristaux, mouvement propre 18 cpm, rendement de comptage 62 %). Le Tableau 6 indique que l'activité spécifique est constante. Le rendement de la transformation de cycloarténol en lanostérol est de 1,6 %.

Une partie du mélange d'acétates de triterpènes non époxydés (20 mg) obtenus dans une autre expérience a été ozonisée (20 mn à -70° en solution dans CH_2Cl_2-Pyridine 99/1) puis l'ozonide obtenu a été réduit (1 h avec une solution de $NaBH_4$ dans l'éthanol absolu). Par extraction et chromatographie on isole un produit qui a même R_F que le acétoxy-3β trinor lanostène-8 ol 24 (10) et dont la radio-activité est négligeable.

Une incorporation de lanostérol 25-^{14}C (10) dans les mêmes conditions n'a pas pu mettre en évidence de transformation de ce produit en un autre triterpène. Les deux incorporations (cycloarténol et lanostérol) ont été également faites dans le latex de E.cyparissias, dont la teneur en lanostérol est très faible, en donnant également des résultats négatifs.

Remerciements

Nous remercions les Drs. Benveniste et Fritig pour leurs conseils et leur aide pour les comptages de radio-activité.

CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

Dans la conclusion du chapitre précédent, nous pensons avoir indiqué l'apport de nos différentes expériences à la connaissance des triterpènes d'Euphorbia :

- en précisant en particulier le caractère d'exception que présente le métabolisme terpénique dans le latex par comparaison au métabolisme général des phytostérols
- en fournissant une explication des modifications qui ont conduit à la diversité qui caractérise ce métabolisme "anormal".

Nous pensons que nos résultats dépassent ce cadre de métabolisme anormal car ils s'insèrent dans un ensemble de travaux réalisés parallèlement sur la biosynthèse des phytostérols à Strasbourg par P.Benveniste et J.D. Ehrhardt , et en Grande Bretagne par L.J. Goad, résultats qui devraient être confirmés prochainement par une transformation enzymatique de cycloarténol en phytostérols.

En ce qui concerne le latex, l'application de méthodes cytologiques et histochimiques pourrait permettre de déterminer la nature des membranes responsables de la synthèse des triterpènes ainsi que la forme de la dispersion de ces produits dans le latex.

La détermination du rôle de ces triterpènes dans le latex,et partant celui du latex dans la plante,est du domaine de la physiologie.

Nous avons postulé au chapitre 6 que les triterpènes du latex sont sans doute dépourvus de rôle chimique.

Pour donner plus de poids à cette hypothèse, on peut envisager de vérifier quelles relations peuvent exister entre le latex et les autres parties de la plante. Fairbairn et El-Masry (1) ont observé que la morphine de

(1) J.W. FAIRBAIRN et S. EL-MASRY, Phytochemistry, 6, 499 (1967)

de Papaver est transformée dans le latex en un produit non alcaloïdique qui est ensuite transféré hors du latex.

Dans notre cas il pourrait être utile de vérifier l'absence de produits d'oxydation ou de dégradation des triterpènes dans les fractions polaires du latex (par exemple après incorporation d'acide mévalonique radio-actif).

D'autre part, la détermination de la structure de l'"euphorbiostéroïde", trouvé en abondance dans les graines de E.lathyris (2) pourrait indiquer un rôle possible des triterpènes du latex.

---

(2) W. TRZEBNY, Bull.Acad. Pol.Sc., 13, 335 (1965)

DEUXIÈME PARTIE

INDICATIONS GÉNÉRALES

Sauf indication contraire, les mesures expérimentales relatives à cette deuxième partie ont été effectuées dans les conditions suivantes :

- spectres infra-rouge (IR) : appareil Beckmann IR 5A, ou appareil Perkin-Elmer 21

- spectres ultra-violet (UV) : spectrophotomètre Beckmann DK2

- spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) : appareil Varian A-60. Les déplacements chimiques sont mesurés à partir du tétraméthylsilane en cycles par seconde (Hz) ou en unités δ pour les forts déplacements chimiques.

- pouvoirs rotatoires ($[\alpha]_D$) : polarimètre automatique Jouan. Mesures à 20° dans le chloroforme.

- courbes de dichroïsme circulaire (DC) : dichrographe Roussel-Jouan Mesures dans le dioxanne.

- microanalyses : Service central de Microanalyse du C.N.R.S. (division de Strasbourg).

- spectres de masse (SM) : appareils Atlas MS9 (I.C.S.N., Gif-Sur-Yvette) et Thomson-Houston (Strasbourg).

- Points de fusion (F) : microscope à platine chauffante Reichert.

Après la plupart des réactions, l'isolement des produits se fait par dilution à l'eau, extraction à l'éther éthylique ou à l'éther de pétrole, lavage avec un acide ou une base, puis avec l'eau, séchage sur sulfate de sodium et évaporation sous pression réduite.

Les chromatographies sur couche mince de silice (analytiques ou préparatives) ont été faites soit avec les plaques finies Merck soit avec des plaques préparées manuellement avec de la silice G.Merck.

C H A P I T R E V I I

REMARQUES SUR L'ÉPOXYDATION DES TRITERPÈNES TÉTRACYCLIQUES

INTRODUCTION :

Pour permettre l'analyse facile de mélanges de triterpènes tétracycliques naturels, nous avons décrit une méthode de séparation chromatographique de ces produits sous forme d'époxydes-acétates (1) : l'acétylation de la fonction alcool en 3β diminue la polarité générale des produits et l'époxydation confère des polarités caractéristiques à des isomères ne différant que par la nature des doubles liaisons. Nous avons mentionné que, dans les cas étudiés, chaque triterpène tétracyclique ne conduisait qu'à un époxyde chromatographiquement homogène, quand bien même il serait possible, pour chaque produit, de prévoir l'obtention de plusieurs épimères.

Nous compléterons maintenant ces observations sur deux plans :

- tout d'abord, nous montrerons qu'il existe dans le cas des triterpènes di-éthyléniques une sélectivité inattendue des deux doubles liaisons, inverse de celle que l'on rencontre généralement, vis-à-vis de l'époxydation ;

- d'autre part, nous montrerons que la double liaison en 24:25 de la chaîne latérale fournit les deux époxydes diastéréoisomères en quantités égales, et qu'il est possible de les séparer par des techniques chromatographiques particulières ;

- enfin, nous montrerons que, dans certains cas tout au moins, l'utilisation de l'éther au lieu du chloroforme comme solvant conduit, non seulement à un ralentissement de l'époxydation, mais encore à une sélectivité préparativement totale.

Dans tous les cas, nous avons utilisé comme réactif l'acide p-nitroperbenzoïque, stable et très efficace (2).

---

(1) G. PONSINET et G. OURISSON, Phytochem., 1965, 4, 799.

(2) M. VILKAS, Bull.Soc.Chim., 1959, p. 1401.

(3) B.M. LYNCH et K.H. PAUSAKER, J.Chem.Soc., 1955, p. 1525.

SELECTIVITE DE L'EPOXYDATION DES TRITERPENES TETRACYCLIQUES

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les deux doubles liaisons du lanostérol ou de l'euphol sont époxydées par l'acide p-nitroperbenzoïque en solution dans le chloroforme. Il est cependant possible, dans le cas du lanostadiène-8,24 par exemple, d'obtenir le monoépoxyde-24:25 $\underline{1}$ par action d'un seul équivalent de réactif époxydant. Cette sélectivité est rendue plus nette si l'on substitue au chloroforme, comme solvant, l'éther dont on sait qu'il diminue singulièrement la réactivité des peracides (2,3).

Dans l'éther, même en présence d'un excès de peracide, seule la double liaison de la chaîne latérale est époxydée avec les acétates de l'euphol ou de l'euphorbol : les monoépoxydes $\underline{3}$ et $\underline{4}$ ainsi obtenus sont aisément caractérisés par leur spectre de RMN qui se présente comme le spectre d'un produit homogène. Comme nous le montrerons ci-dessous, il s'agit en fait dans chaque cas d'un mélange des deux diastéréoisomères en C-24, mais il est impossible de les séparer par les techniques habituelles de cristallisation ou de chromatographie ; ce mélange se comporte comme un produit défini.

On sait que les peracides sont peu sensibles à l'encombrement stérique de la double liaison, puisqu'aussi bien les doubles liaisons aussi encombrées que celles de l'euphorbol en 8:9 (4), de l'isoeuphol en 13:17 (5) et du dérivé Δ^{18} de la friedeline (6) sont époxydées. Cependant, dans le cas de l'α-amyrine nous avons vérifié que le produit de l'oxydation de la double liaison 12:13, dans les conditions décrites ici, est bien la cétone $\underline{5}$ (7). Des dérivés éthyléniques très encombrés comme le longifolène (8,9) réagissent anormalement, mais avec une vitesse raisonnable.

Malgré cette faible sensibilité aux effets stériques, il est clair que les exemples d'attaque sélective de la chaîne latérale,

(4) J.B. BARBOUR, J.Chem.Soc., 1951, p. 2537.

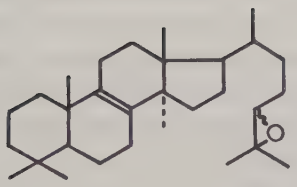
(5) M. VILKAS, Bull.Soc.Chim., 1950, p. 582.

(6) F. PATIL, Thèse Docteur Université, Strasbourg, 1966.

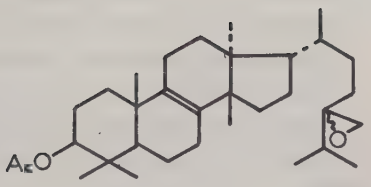
(7) G.G. ALLAN, F.S. SPRING et R. STEVENSON, J.Chem.Soc., 1955, p.3072.

(8) P. NAFFA et G. OURISSON, Bull.Soc.Chim., 1954, p. 1115.

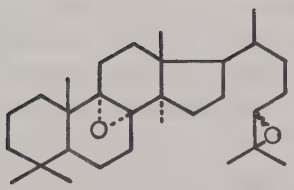
(9) U.R. NAYAK et Sukh DEV, Tetrahedron, 1963, 19, 2269.



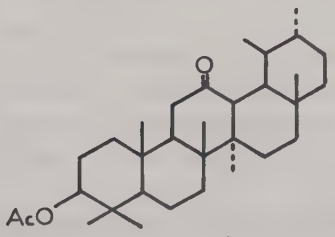
1



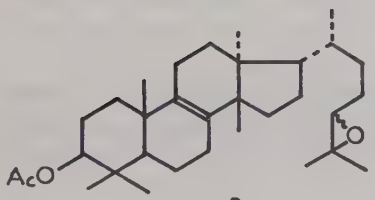
4



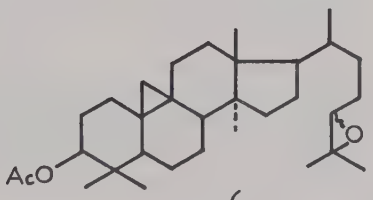
2



5



3



6

cités plus haut, traduisent la grande différence d'encombrement des doubles liaisons de la chaîne latérale et du squelette cyclique. Il n'en reste pas moins que ce facteur de sélectivité doit ici compenser un facteur électronique qui, normalement, devrait favoriser l'époxydation de la double liaison cyclique. Il est en effet bien connu depuis BOESEKEN et STUURMAN (10) que l'augmentation du nombre des substituants de la double liaison conduit à une accélération de l'époxydation. Le caractère électrophile du peracide est en effet très sensible à la basicité de la double liaison, qu'augmente le pouvoir donneur des substituants alcoyles, C'est ainsi que le tétraméthyléthylène est environ mille fois plus rapidement attaqué que l'éthylène. Il est donc remarquable de voir ici une double liaison trisubstituée (1,3) ou même méthylénique (4) époxydée plus facilement qu'une double liaison tétrasubstituée, mais plus encombrée.

Des résultats cités ci-dessus nous retiendrons en tout cas une conclusion pratique : la méthode analytique que nous avons décrite (1) n'est effectivement valable que dans les conditions que nous avions définies, donc avec le chloroforme comme solvant et un excès d'acide. En outre, il devient possible, pour une étude rapide des triterpènes tétracycliques par "chromatographie fonctionnelle" (11), d'utiliser également la formation des monoépoxydes.

COURS STERIQUE DE L'EPOXYDATION DES DOUBLES LIAISONS 24:25

Les époxydes 24:25 que nous avons décrits jusqu'ici sont homogènes en chromatographie sur couche mince, dans les conditions habituelles. Il est cependant possible de les séparer en deux diastéréoisomères en utilisant des techniques particulièrement efficaces.

Par exemple, l'acétate-époxyde du cycloarténol peut être fractionné sur une chromatoplaque préparative en utilisant une élution continue, avec un solvant peu polaire que l'on évapore en extrémité

(10) J. BOESEKEN et J. STUURMAN, Rec. Trav.Chim. Pays-Bas, 1937, 56, 1034.

(11) G. MATHIS et G.OURISSON, J. Chromatog., 1963, 12, 94.

de plaque. Cette technique, très efficace pour séparer des produits très voisins, permet ici d'isoler deux produits, 6a et 6b de propriétés physiques différentes mais de spectres de RMN superposables. La réduction de l'un et de l'autre de ces époxydes par le tétrahydruro-aluminate de lithium donne le cycloartanediol-3 β, 25 (12). Il s'agit donc bien des deux époxydes diastéréoisomères en C-24.

La proportion des deux isomères dans le produit de réaction n'a pu être déduite de façon précise de cette séparation. Nous avons pu montrer par une technique utilisant des produits marqués que les deux isomères sont présents en quantités approximativement égales. L'acétate-époxyde 6 a été préparé à partir de cycloarténol 2-^{3}H préparé pour des études biosynthétiques (13).
Une quantité impondérable de ce produit, correspondant à une activité mesurée d'environ 10^{6} désintégrations par minute, a été fractionnée sur une chromatoplaque analytique en utilisant un éluant peu polaire.

Par élutions successives, séparées par un séchage de la plaque, il devient peu à peu possible de déceler un élargissement, puis un dédoublement, du pic de radioactivité lu par analyse directe de la plaque au lecteur de plaques Berthold. Après cinquante élutions, on obtient un dédoublement complet (Fig.1). L'utilisation d'une quantité impondérable de produit permet ici d'avoir des pics fins malgré la diffusion, inévitable avec des durées d'élution de plusieurs heures au total.

L'intégration des pics montre que le produit d'époxydation est constitué par le mélange des deux épimères en quantités égales. L'induction asymétrique des centres C-20 et C-17 est donc pratiquement nulle vis-à-vis de l'époxydation en C-24 et l'homogénéité apparente des époxydes décrits antérieurement (1) provient de leur quasi-identité spectrale, et des difficultés de leur séparation.

---

(12) R. McCRINDLE et C. DJERASSI, Chem. and Ind., 1961, p. 1311.

(13) J.D. EHRHARDT, M.F. LHOMME, S. CORSANO, G. TELLER et G. OURISSON, Travaux non publiés.

Ainsi, on peut noter également que nous ne sommes pas parvenus à fractionner le monoépoxyde de lanostadiène 1 dans les mêmes conditions. Nous sommes évidemment convaincus que, dans tous les cas de ce type, les deux époxydes sont formés simultanément, et en quantités pratiquement identiques. Par contre, il est probable que les époxydes 24:25 naturels décrits récemment (14) sont stériquement homogènes.

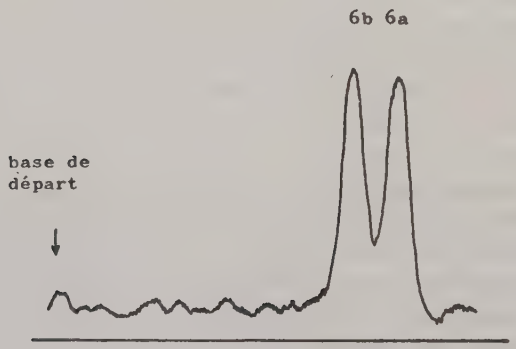


Fig.1. Diagramme de radioactivité des diastéréoisomères 6a et 6b séparés sur chromatoplaque .

(14) D. SHIENGTHONG, A. VERASARN, P. NANONGGAI-SUWANRATH et E.W. WARNHOFF, Tetrahedron, 1965, 21, 917
C.W.L. BEVAN, D.E.U. EKONG, T.G. HALSALL et P. TOFT, J.chem.Soc., (C), 1967, p. 820.
A. CHATTERJEE et A.B. KUNDU, Tetrahedron Letters, 1967, p. 1471.

PARTIE EXPERIMENTALE

Toutes les époxydations mentionnées ont été faites à température ordinaire avec l'acide p-nitroperbenzoïque à 98 % Prolabo. Après réaction, l'isolement de l'époxyde se fait aisément par filtration du milieu réactionnel sur une colonne d'alumine éluée par un mélange éther de pétrole-éther 1/1.

Les pouvoirs rotatoires sont mesurés dans $CHCl_3$; les spectres de RMN sont mesurés à 60 MHz dans $CDCl_3$ (sauf indication contraire) ; les points de fusion sont mesurés au microscope Reichert.

Epoxy-24:25 lanostène-8 1

A une solution agitée magnétiquement de 300 mg de lanostadiène-8,24 dans 20 ml de $CHCl_3$, on ajoute goutte à goutte en 4 h une solution de 136 mg d'acide p-nitroperbenzoïque dans 30 ml de $CHCl_3$. Le produit isolé est recristallisé (éther-méthanol).

F = 86-88° ; $[\alpha]_D$ = + 57°

Analyse : $C_{30}H_{50}O$: Calc. % C 84,44 H 11,81
Tr. 84,7 11,7

RMN : Epoxyde 24:25 : CH_3 : 75 et 78 Hz (s , 2 x 3H) ; $-\underline{CH}-C<$ (O) : 160 Hz (t mal défini).

Diépoxy-8:9 , 24:25 lanostane 2

On laisse réagir 300 mg de lanostadiène-8,24 et 300 mg d'acide p-nitroperbenzoïque dans $CHCl_3$. Au cours de la réaction le contrôle par chromatographie en couche mince indique la présence du produit 1 dans le mélange réactionnel. Après 12 h de réaction, le

produit 1 a disparu ; un autre produit 2, plus polaire, est obtenu et recristallisé dans l'acétonitrile :

F = 83-85° ; $[\alpha]_D$ = 0°

Analyse : $C_{30}H_{50}O_2$: Calc. % C 81,39 H 11,38
Tr. 81,1 11,4

RMN : en plus des signaux mentionnés pour 1 ; CH_3 : à 68 Hz
(s) : signal du méthyle en C-14 déplacé par l'époxyde 8:9

Acétoxy-3β époxy-24:25 euphène-8 3

On laisse réagir pendant 4 h 300 mg d'acétate d'euphol et 300 mg d'acide p-nitroperbenzoïque dans l'éther. Le produit obtenu est recristallisé (éther-méthanol).

F = 126-128 ; $[\alpha]_D$ = + 31°

Analyse $C_{32}H_{52}O_3$: Calc. % C 79,28 H 10,81
: Tr. 79,2 10,95

RMN : mêmes éléments que ceux qui ont été mentionnés pour 1.
Le spectre ne présenta pas de signal de méthyle vers 64 Hz qui serait dû à l'influence d'un époxyde en 8:9 sur un méthyle voisin, comme dans le diépoxyde d'euphol (1).

Un contrôle par chromagraphie en couche mince indique qu'après 48 h de réaction dans l'éther le diépoxyde ne se forme pas. La même réaction dans le chloroforme ou le benzène conduit quantitativement au diépoxyde en 12 h.

Acétoxy-3β époxy-24:28 euphorbène-8 4

La même réaction que pour 3 donne en 12 h un produit, qui est recristallisé dans le méthanol

F = 143-146° ; $[\alpha]_D$ = 0°

Analyse : $C_{33}H_{54}O_3$: Calc. % C 79,46 H 10,92
Tr. 79,35 10,8

RMN : $-\overset{O}{\overset{\diagup\diagdown}{C}}-CH_2$: 154 Hz (d, 2H, J = 2 Hz) époxyde 24:28. Le spectre ne possède pas de signal de méthyle à 64 Hz.

En opérant dans le chloroforme ou le benzène on obtient le diépoxyde (1).

Les deux produits 3 et 4 peuvent également être obtenus par addition lente d'un équivalent de peracide dans le chloroforme comme pour 1.

Acétoxy-3β céto-12 ursane 5

On laisse réagir pendant 48 h 100 mg d'acétate d'α-amyrine avec 200 mg d'acide p-nitroperbenzoïque dans $CHCl_3$. Le produit obtenu est recristallisé dans le méthanol.

F = 198-200° ; $[\alpha]_D$ = + 108°

Litt. (7) : F = 210-211° ; $[\alpha]_D$ = + 115°

IR ($CHCl_3$) 1705 cm^{-1} (cétone) , 1730 cm^{-1} (acétate)

RMN : pas de proton porté par un carbone oxygéné.

Séparation des épimères 6a et 6b

Le produit brut de l'époxydation de l'acétate de cycloarténol (80 mg) est déposé sur une plaque préparative (18 x 24 cm) de silice (Merck G). La plaque est éluée pendant 170 h avec un mélange de cyclohexane-acétate d'éthyle 98/2. Le sommet de la plaque dépasse à l'extérieur de la cuve et est chauffé par une lampe de 40 W pour faciliter l'évaporation du solvant.

On récupère deux produits : 6a 20 mg (produit le moins polaire) et 6b 32 mg.

Les produits sont recristallisés (chloroforme-méthanol)

6a : F = 166-167° ; $[\alpha]_D$ = + 41°

6b : F = 161-162° ; $[\alpha]_D$ = + 56°

Les spectres de RMN des deux produits dans $CDCl_3$ sont superposables et identiques au spectre déjà décrit pour le mélange, F = 143-144° (1). Dans le benzène, les signaux des méthyles 26 et 27 sont rassemblés à 71 Hz au lieu de 75 et 78 Hz dans $CDCl_3$.

Réduction de 6a et 6b

Chacun des deux produits 6a et 6b (10 mg) est traité dans l'éther anhydre par 10 mg de $LiAlH_4$. Après 12 h d'agitation à température ordinaire le produit est extrait et recristallisé (éther-méthanol). Par chromatographie en couche mince et point de fusion de mélange, les produits sont identifiés au cycloartanediol-3β,25 obtenu par hydrogénation du cycloartène-23 diol-3β,25 , que nous avons extrait de Euphorbia helioscopia L. (15).

F = 185-186° ; $[\alpha]_D$ = +49°

Litt. (12) ; F = 187-188° ; $[\alpha]_D$ = + 45°

Mesure du rapport des deux épimères 6a et 6b

Une quantité impondérable contenant environ 10^6 d.p.m. de $^3H_2$-2 cycloarténol est acétylée à froid, époxydée (12 h dans le chloroforme) et déposée sur une plaque analytique Merck de silice F 254 (20 x 5 cm) avec les produits 6a et 6b de part et d'autre. Après 50 élutions successives avec un mélange cyclohexane-acétate d'éthyle 98,5/1,5 les produits 6a et 6b forment deux taches distantes de 1 cm, ayant migré de 6 cm. L'analyse de la plaque au lecteur de plaques Berthold fournit le diagramme de la figure 1.

---

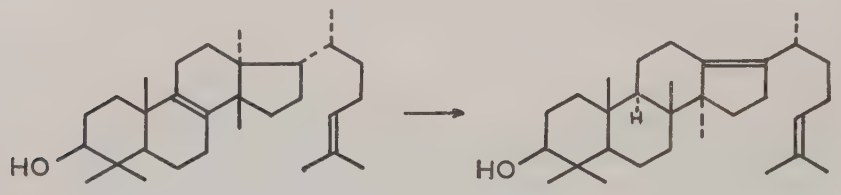
(15) G. PONSINET et G. OURISSON, Phytochem., 6, 1235, (1967) (chapitre V)

C H A P I T R E VIII

MÉCANISME DE L'ISOMÉRISATION DE L'EUPHOL

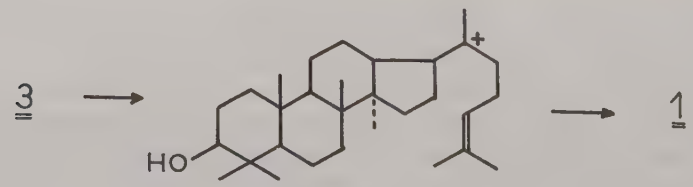
Bien qu'il ne présente que des résultats préliminaires, nous avons inclus ce court chapitre : en effet, la conclusion provisoire à laquelle il nous conduit n'est pas sans rappeler le mécanisme des transpositions accompagnant la formation des triterpènes (en particulier la formation et l'ouverture du cyclopropane du cycloarténol).

La transposition de l'euphol 1 en isoeuphol 2 est une réaction connue depuis longtemps. Elle a d'ailleurs contribué à la détermination de la structure de l'euphol (1).



1 2

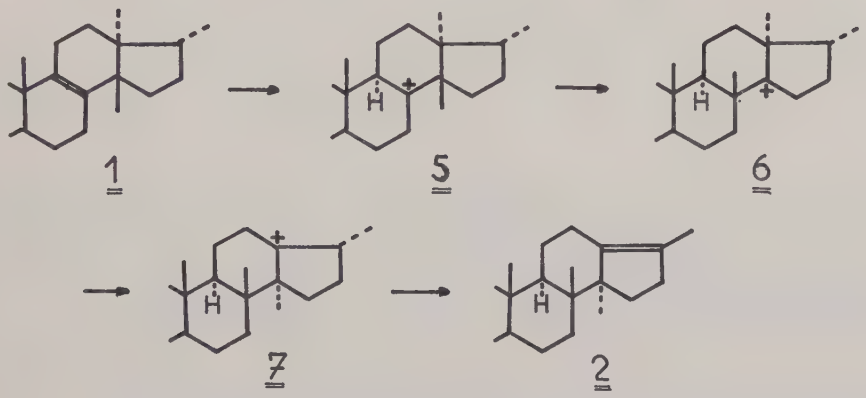
Cette réaction est importante car elle réalise une corrélation entre deux séries de produits naturels (euphane et dammarane), et elle représente la transposition inverse de celle qui accompagne la cyclisation du squalène 3 en euphol 1.



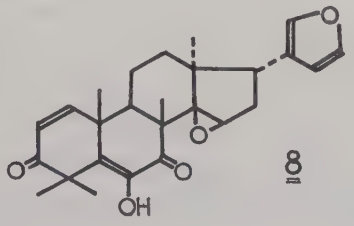
(1) La bibliographie relative à cette introduction se trouve dans l'ouvrage de G. OURISSON, P. CRABBÉ et D.R. RODIG, Tetracyclic Triterpenes, Hermann, Paris 1964.

La réaction 1 ⟶ 2 s'explique par une diminution de la tension due à la conformation bateau du cycle B même si elle introduit en même temps une interaction entre les méthyles axiaux 10 et 8.

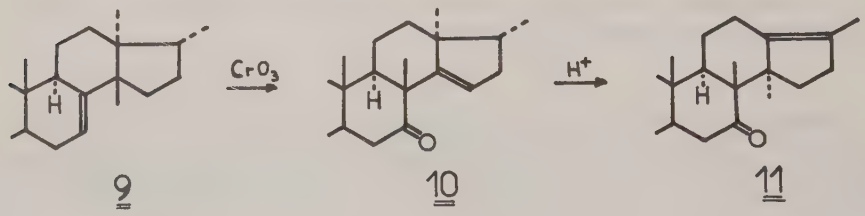
Le problème s'est posé de savoir si la transposition des deux méthyles se fait ou non de façon concertée.



La connaissance de ce mécanisme trouve un intérêt du fait de l'existence de produits naturels, tels la cédrélone 8, dont le squelette peut-être dérivé de la forme stabilisée de l'ion 6.



Enfin on sait que l'oxydation chromique du butyrospermol 9 conduit à une cétone non conjuguée pour laquelle la structure 10 a été proposée et qui peut être transposée en céto-7 isoeuphol 11

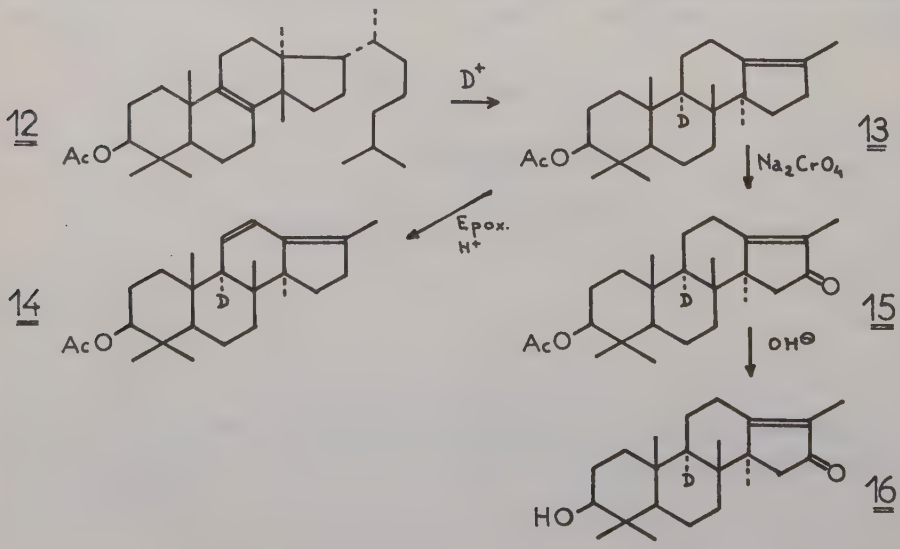


9 10 11

Nous avons cherché à vérifier si dans l'isomérisation de l'euphol; l'ion 6 peut être stabilisé en une double liaison 14,15, système que l'on sait réalisable avec le produit 10.

RÉSULTATS

L'acétate d'euphénol[12] a été traité en milieu acide deutérié (TsOD/AcOD) et nous avons cherché à déterminer dans l'acétate d'isoeuphénol 13 obtenu le nombre et la position des atomes de deutérium.



Ceci a été réalisé en comparant les spectres de masse des produits $\underline{\underline{13}}$, $\underline{\underline{14}}$, $\underline{\underline{15}}$ et $\underline{\underline{16}}$, produits décrits dans la littérature.

Une précaution préliminaire a consisté à traiter l'acétate d'iso-euphénol non deutérié par l'acide deutérié ci-dessus, pour s'assurer que la transposition n'est pas réversible. Il n'y a pas d'échange, ce qui démontre en outre qu'aucun D ne peut être introduit en 12, 16 ou 20.

Nous avons vérifié également que la méthode d'extraction et de purification par chromatographie (SiO_2) et cristallisation ne modifie pas la répartition des atomes D dans la molécule.

Le produit $\underline{\underline{13}}$ obtenu par la réaction ci-dessus possède trois D. En plus de celui qui est fixé nécessairement en 9α il nous faut donc en localiser deux.

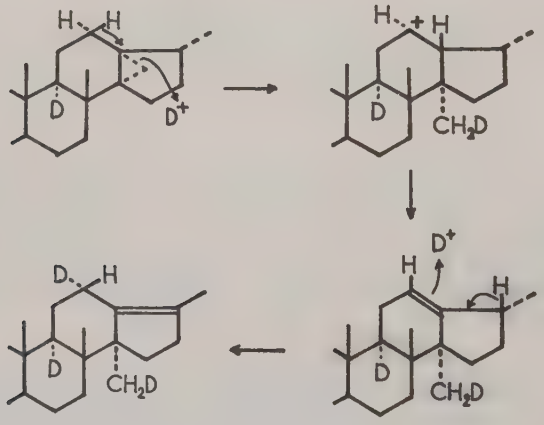
Le spectre de masse de $\underline{\underline{13}}$ nous indique qu'aucun D n'est fixé dans la chaîne latérale.

Le diène $\underline{\underline{14}}$ ne possède plus que deux atomes D. Ceci signifie que l'un des trois D à localiser était en 12. De plus le spectre de RMN de $\underline{\underline{14}}$ présente pour les protons vinyliques le même signal très aplati que celui du diène non deutérié, ce qui signifie que $\underline{\underline{14}}$ ne possède pas de D en 12.

La cétone conjuguée $\underline{\underline{15}}$ contient trois D ainsi que le céto-alcool $\underline{\underline{16}}$ obtenu par traitement alcalin (NaOH/dioxanne). Comme nous avons vérifié que le produit $\underline{\underline{16}}$ non deutérié acquiert deux unités de masse par traitement par NaOD/dioxanne, nous pouvons également éliminer la présence de D en 15.

Ce résultat nous montre que l'ion $\underline{6}$ ne se stabilise pas en double liaison 14,15 au cours de la réaction. Mais il ne nous permet pas de localiser le troisième D, ce qui expliquerait mieux le mécanisme. En particulier, la localisation d'un atome D sur l'un des méthyles transposés indiquerait que la migration de ce méthyle passe par l'intermédiaire d'un cyclopropane.

La présence d'un atome D en 12 indiquerait que l'ouverture du cyclopropane 13,14 α est accompagnée de la perte d'un proton en 12 avant formation de la double liaison 13,17



PARTIE EXPÉRIMENTALE

Préparation des réactifs

L'acide acétique AcOD (98 % D) est préparé par agitation 12 h à température ordinaire d'un mélange stoechiométrique d'anhydride acétique et d'eau lourde, suivie de distillation de l'acide.

L'acide p-toluène sulfonique TsOD est préparé par chauffage 2 h à reflux d'un mélange de chlorure de tosyle avec un excès d'eau lourde. L'évaporation sous vide suivie d'un nouveau traitement identique conduit à un produit solide recristallisé dans l'eau lourde (F = 100-102°).

Isomérisation de l'euphol

L'acétate de dihydro euphol (1g) est traité par un mélange de TsOD (50 mg) et AcOD (15 ml). Après 8 h de reflux sous azote, on extrait à l'éther de pétrole, lave à la soude puis à l'eau.

Par chromatographie, on obtient 800 mg de produit $\underline{\underline{13}}$ qui est cristallisé dans l'éthanol :

F = 110-111° Litt. (2) F = 112-113°

M = 473

Préparation du diène $\underline{\underline{14}}$

Le produit précédent (100 mg) est époxydé par de l'acide p-nitroperbenzoïque dans le chloroforme (12 h à température ordinaire). L'époxyde est isolé de la manière habituelle et traité par une solution à 1 % de HCl dans le méthanol. Après 5 mn à température ordinaire le produit est extrait et chromatographié. Le diène $\underline{\underline{14}}$ est identifié par son spectre UV conforme à celui de

(2) M.C. DAWSON, T.G. HALSALL et R.E.H. SWAYNE, J.Chem.Soc., 590 (1953).

la littérature (3) :

UV (EtOH) : 246 mμ (ε = 18 000)
255 (ε = 22 000)
264 (ε = 14 000)

M = 470

Oxydation chromique de 13 selon Fétizon (4)

Le mélange suivant est agité cinq jours à température ordinaire sous azote :
acétate 13 (400 mg) , $Na_2C_2O_4$ (400 mg), AcONa (300 mg)
benzène (2,8 ml), AcOH (4 ml), Ac_2O (2 ml)

Par extraction et chromatographie on obtient 200 mg de la cétone 15 qui est identifiée (5) par :

IR ($CHCl_3$) : 1730, 1685, 1633 cm^{-1}
UV (EtOH) : 243 mμ (ε = 12 000)
M : 487

Traitement alcalin de 15

La cétone 15 (20 mg) est traitée selon Djerassi et al.(6) 10 mn à 70° par 2 ml d'un mélange de dioxanne (1 ml), eau (1 ml), sodium (10 mg).

Le produit est extrait de la manière habituelle et la réaction est répétée deux nouvelles fois. Par chromatographie, on isole un céto-alcool 16 qui a même UV que la cétone 15 et dont la masse moléculaire est M = 445

Echange alcalin de la cétone 16 non deutériée

La même réaction que précédemment où D_2O remplace l'eau est réalisée avec 20 mg de céto-alcool 16 non deutérié. La masse moléculaire du produit obtenu est 444.

(3) D.H.R. BARTON, J.F. McGHIE, M.K. PRADHAN et S.A. KNIGHT, J.Chem.Soc., 876 (1955).

(4) M. FÉTIZON et G. MOREAU, Bull.Soc.Chim.France, 3479 (1965).

(5) D.ARIGONI, R. VITERBO, M. DÜNNENBERGER, O. JEGER et L. RUZICKA, Helv.Chim. Acta , 37, 2306 (1954).

(6) E.LUND, H. BUDZIKIEWICZ, J.M. WILSON et C. DJERASSI, J.Amer.Chem.Soc., 85, 941 (1963).

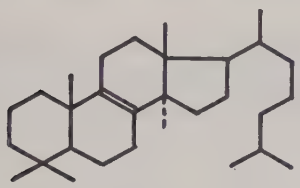
C H A P I T R E I X

ESSAI DE TRANSPOSITION DANS LA SÉRIE DU LANOSTÈNE-8*

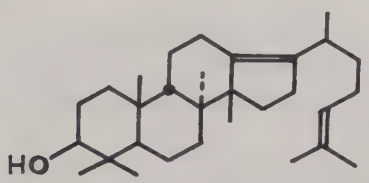
*Ce travail a été réalisé en collaboration avec D.E.CASE

Nous avons vu au chapitre précédent que la transposition de l'euphol en isoeuphol s'obtient par un traitement acide relativement modéré et s'explique par une diminution de contraintes stériques : l'obtention de cycles chaises compense largement l'interaction introduite entre les méthyles 8β et 10β .

Dans la série du lanostène-8 1 une telle transposition n'a jamais pu être réalisée et ceci s'explique par la formation très défavorable de cycles B et C bateaux. On peut toutefois noter qu'une telle structure a été proposée récemment pour un produit naturel : le protolanostérol (1) 2 .



1



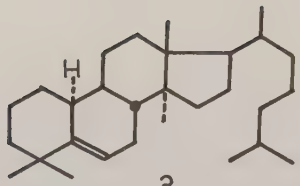
2

Nous avons cherché à orienter différemment le réarrangement de la double liaison 8,9 du lanostérol : de nombreux exemples de transpositions de méthyles angulaires en séries triterpénique et stéroidique (2) permettaient d'espérer réaliser la transposition du méthyle de 10β en 9β , conduisant

---

(1) W.O. GODTFREDSEN, communication particulière.

(2) se reporter à Molecular Rearrangements, Ed. P.de Mayo, Interscience Publ., New York 1964, Tome II, p. 771 et 1019.

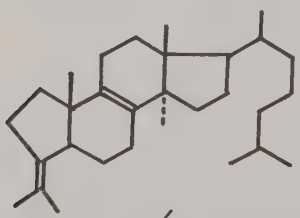


3

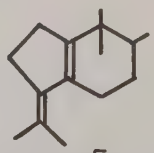
ainsi à des dérivés du cucurbitane 3, squelette qui caractérise la structure d'un grand nombre de principes amers de cucurbitacées.

RÉSULTATS

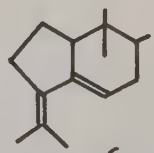
En premier lieu, nous avons tenté une transposition du A-néo lanostènol 4 en vue de préparer l'un des diènes 5 ou 6 (6 est un chromophore connu dans un dérivé du simiarénol (3)).



4

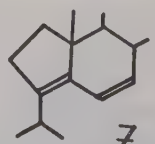


5



6

Plusieurs traitements acides ont été essayés ($TsOH/HCO_2H$, TsOH / $CH_3-CH_2Br-CO_2H$, CF_3CO_2H pur). Seul le dernier a fourni un diène dont les caractéristiques spectrales sont compatibles avec la structure 7, ce qui indique que, au lieu de la transposition cherchée, il y aurait eu migration de la

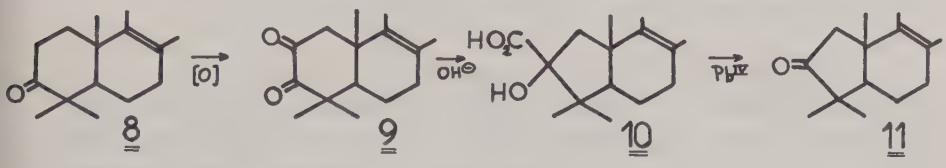


7

(3) R.T. APLIN, H.R. ARTHUR et W.H. HUI, J.Chem.Soc., 1251 (1966).

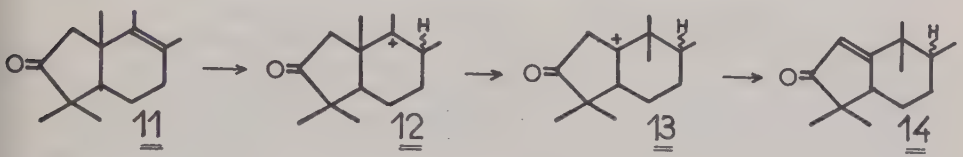
double liaison de 8,9 en 5,6.

Pour tenter un autre type de transposition sur un substrat plus favorable, nous avons préparé la A-norlanosténone 11. Cette préparation à partir de la lanosténone-3 8 se fait avec un rendement global de 35 % en utilisant des réactions décrites dans d'autres séries.



8 9 10 11

La transposition du méthyle de 10β en 9β , amorcée par la protonation de la double liaison 8,9 , devrait être favorisée et contrôlée par l'obtention d'une cyclopenténone conjuguée 14.



11 12 13 14

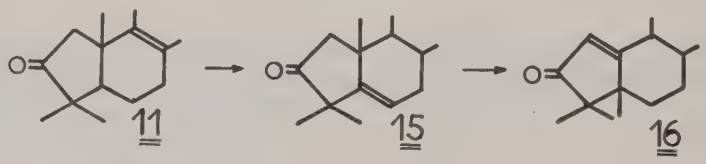
Il faut noter que si ce mécanisme est concerté, l'approche du proton doit se faire par la face α ce qui conduit à une jonction de cycles BC trans alors que celle des cucurbitacines est cis. En fait, l'examen des modèles de Dreiding des deux épimères 14, montre pour le produit attendu (8α H) une conformation bateau des cycles B et C et une très forte interaction des méthyles 10 et 13.

Différents milieux acides (H_2SO_4/AcOH, $HClO_4$/$CHCl_3$, $HClO_4$/AcOH , HI/AcOH) ont été essayés sans succès. Seul l'acide trifluoracétique pur à reflux a conduit à une cétone conjuguée.

Le produit de réaction contient, en plus de 30 % de produits de départ, 10 % d'hydrocarbures aromatiques et 50 % d'un produit A non cristallisé. Ce produit A n'a pu être fractionné de façon efficace par chromatographie sur silice ou alumine (colonne avec un rapport $\frac{\text{adsorbant}}{\text{produit}}$ élevé, plaques préparatives avec élution continue plusieurs jours), les différentes fractions obtenues étant hétérogènes sur chromatoplaques bidimensionnelles.

Le mélange A fournit des spectres IR et UV compatibles avec une cyclopenténone conjuguée. Il donne, de plus, une dinitrophénylhydrazone (non cristallisable) rouge-violacée dont le spectre UV est également caractéristique d'une cyclopenténone conjuguée. Par contre le spectre de RMN ne présente qu'un signal mal résolu vers $\delta = 5{,}7$.

L'obtention d'une cétone insaturée n'est pas un critère suffisant de contrôle de la transposition de 10 en 9. En particulier, la structure 16 ne



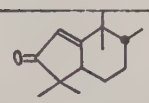
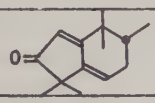
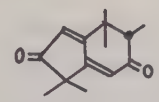
peut être exclue a priori, l'exemple du produit 7 montrant que la double liaison peut migrer dans le cycle B.

Pour éliminer la structure 16 ainsi que la possibilité d'un mélange d'épimères en 5 provenant d'une stabilisation de l'ion 13, nous avons cherché à préparer à partir de A les dérivés 17 et 18, dont les chromophores sont connus dans des dérivés de cucurbitacines (4) (Tableau 1).

Le mélange de cyclopenténones A a donc été oxydé par SeO_2 dans le diglyme. La réaction fournit avec un rendement de 50 % un produit non cristallisé B dont les caractéristiques spectrales sont voisines de celles de 17. Mais ce produit n'a pu être fractionné efficacement en produits cristallisés par chromatographie dans les mêmes conditions que pour A.

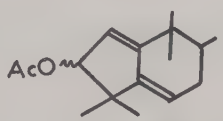
(4) D. LAVIE, Y. SHVO, D.R. GOTTLIEB et E. GLOTTER, Tetrahedron Letters, 615 (1961).
W.T. KOCH, P.R. ENSLIN, K.B. NORTON, D.H.R. BARTON, B. SKLARZ et A.A. BOTHNER-BY, Tetrahedron Letters, 309 -(1962).

TABLEAU 1

	UV (EtOH) mμ	IR* ($CHCl_3$) cm^{-1}	RMN	Réf.
14 	236 (ε = 16300)	1695 1590	d. δ =5,58 (J=2Hz)	5
17 	289 (ε = 9000)	1707		4
18 	282 (ε = 18700)	1717 1709 1666 1569	d. δ =6,08 (J=1Hz) d. δ =6,21 (J=1Hz)	4

* D'autres groupes cétoniques saturés sont présents dans les produits décrits

Par réduction au borohydrure de sodium, le mélange B fournit un mélange d'alcools dont les acétates ont un spectre UV caractéristique d'un diène hétéroannulaire tel que 19



19

Le mélange B a été oxydé par le chromate de sodium dans les conditions décrites par Fétizon et Moreau (6). Cette réaction donne un produit non cristallisé C qui a été fractionné successivement sur colonne et plaques préparatives à élution continue. Quatre produits D, E, F, et G, de polarités croissantes, représentant respectivement 71, 7, 10 et 12 % de C ont été obtenus.

Les produits D et G sont solides mais n'ont pu être cristallisés.

---

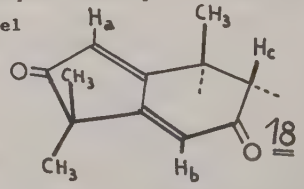
(5) D. LAVIE et B.S. BENJAMINOV, Tetrahedron, 20, 2665 (1964).

(6) M. FÉTIZON et G. MOREAU , Bull.Soc.Chim.France, 3479 (1965).

Les caractéristiques spectrales sont indiquées dans le tableau n° 2 . Les spectres IR sont pratiquement superposables. Les spectres UV sont très proches. Les spectres IR et UV sont très voisins de ceux de la diènedione 18. En RMN les quatre produits présentent deux signaux distincts, de un proton chacun, vers $\delta = 6$. Dans les quatre spectres, on observe un fort déplacement vers les champs faibles de la plupart des signaux des méthyles par rapport à leur position normale. Enfin les spectres de masse vérifient la masse moléculaire 424 et possèdent un grand nombre de pics communs.

E et F, produits mineurs et résineux, donnent en RMN des signaux mal définis et sont sans doute encore impurs bien qu'ils soient homogènes sur chromatoplaques dans les conditions d'élution très sélectives qui distinguent les produits DEFG.

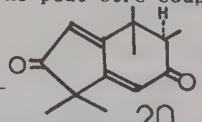
G a sans doute une chaîne latérale modifiée car son spectre de masse ne présente pas le mic M-113 dû à la perte de cette chaîne latérale et son spectre de RMN ne possède pas les deux pics des méthyles 26 et 27 à 49 et 54 Hz. De plus, l'un des signaux de protons vinyliques n'est pas un doublet mais un quartet, ce qui peut suggérer un système tel que 18 où Ha et Hb sont coplanaires et couplés comme l'indique le Tableau 1. Hb et Hc sont orthogonaux et peuvent être couplés à travers la cétone (7).



Malheureusement, le spectre publié du produit 18, pris sur un appareil ancien, ne permet pas d'observer le couplage J_{bc}.

Par contre, un argument supplémentaire pour la structure 18 est fourni par le spectre UV de G qui présente le même maximum d'absorption à 282 mμ alors que celui de D est à 279,5 mμ.

Le produit D est le constituant majeur du mélange C. Par comparaison avec le produit G le signal obtenu en RMN (deux doublets) suggère la structure 20 où l'hydrogène en 8α ne peut être couplé avec l'hydrogène en 6.



20

(7) de tels couplages sont cités dans la revue de S. Sternhell, Rev.Pure Applied Chem., 14, 15 (1964).

TABLEAU 2

Produit	I R (cm^{-1}) $CHCl_3$	U V (mμ) EtOH	R M N			D. C. mμ	S.M.
			Protons vinyliques	Méthyles déblindés (Hz)	Méthyles normaux (Hz)		
	1710	279,5	1H δ = 6,12	72,5	55		
	1670	(ε= 18100)	(d J=1,5)	70,5	52,5	348	424
D	1630					(-1,67)	
	1580		1H δ = 5,89	65,5	49		
	870		(d J=1,5)				
	1710		1H δ = 6,20	72	55		
	1660	280	(mal résolu)	67,5	49	346	424
E	1630	(ε= 19400)	1H δ = 6,03			(-0,98)	426
	1580		(mal résolu)				
	870						
	1710		1H δ = 6,20	71,5	54	348	
	1660	282	(mal résolu)		48,5	(-1,14)	424
F	1630	(ε= 23000)					
	1580		1H δ = 5,92				
	870		(mal résolu)				
	1710		1H δ = 6,19	74	50,5	350	424
	1660	282	(d J=1,5)	71		(-1,51)	r
G	1630	(ε= 27400)	1H δ = 5,88				
	1580		(q. J_1=1,5)				
	870		J_2=0,8)				

L'absence de travaux antérieurs permettant d'exploiter les résultats de dichroisme circulaire et de spectrométrie de masse ne nous a pas permis d'obtenir d'autres preuves de cette structure. Un traitement alcalin de D et G (3 h à reflux dans la potasse alcoolique) n'a pas permis de modifier la forme de ces signaux.

DISCUSSION

L'obtention, au niveau des diènes-diones, de quatre homologues, au lieu des deux épimères en 8 attendus, est la principale cause d'incertitude des résultats ci-dessus.

La modification de la chaîne latérale du produit G est également difficile à expliquer. Comme il est très improbable qu'il s'agisse d'une impureté du lanostérol de départ, on est obligé de postuler une migration réversible de la double liaison jusque dans la chaîne latérale. Pour justifier cette hypothèse, nous avons traité le lanostène-8 dans les mêmes conditions acides que la A-norlanosténone. Mais il semble alors intervenir une réaction parasite de "dismutation" avec formation de diènes et d'hydrocarbures saturés. Cette dernière fraction est d'ailleurs un mélange non résolu par C.P.G.

CONCLUSION

L'impossibilité de fractionner les produits de réaction et d'obtenir des produits cristallisés a conduit à investir un travail important dans cette étude qui finalement n'a pas été concluante.

L'utilisation de substrats plus simples, ou facilitant la cristallisation des produits, pourrait permettre de résoudre des problèmes laissés en suspens :

- stéréochimie de la transposition qui conduirait aux deux épimères en 8 ;

- aromatisation partielle du cycle B explicable par les travaux de Bey et Ourisson (8) ;

- hydrogénation d'une double liaison tétrasubstituée par traitement avec CF_3CO_2H pur, réaction à revoir par comparaison à d'autres hydrogénations récemment décrites et utilisant le même acide comme donneur de proton associé à un générateur d'hydrure (9).

Il semble néanmoins assuré que la transposition lanostane-cucurbitane est réalisable, bien que difficilement contrôlable dans les conditions que nous avons utilisées.

Remerciements : Nous remercions MM. B. Dietrich et J.Blanzat pour leur aide technique.

---

(8) P.BEY, Thèse Doctorat, Strasbourg (1967).

(9) D.N. KURSANOV, Z.N. PARNES, G.I. BASSOVA, J.M. LDIM, V.I.ZDANOVICH, Tetrahedron, 23 2235 (1967).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Traitement acide du A-néo lanosténol

Du A-néo lanosténol (400 mg), préparé selon Dorée et al.(10) est traité par CF_3CO_2H (30 ml) à reflux sous azote pendant 6 jours. Après distillation de la moitié de l'acide, extraction et chromatographie sur SiO_2-$AgNO_3$ on obtient un produit huileux :

UV 236 mμ (ε = 20 000)

RMN : pas de méthyles sur double liaison, massif mal résolu de deux protons vers 7 ppm.

Le produit n'a pas été caractérisé davantage.

Oxydation de la lanosténone selon Barton

On ajoute 14 g de lanosténone à une solution de 2 g de potassium dans 1 l de t-butanol. Le mélange est agité sous atmosphère d'oxygène jusqu'à ce que 1 mole d'oxygène soit absorbée. La réaction est renouvelée sur la même quantité de lanosténone. On obtient après extraction 26 g d'un produit cristallisé identifié à la dione 9

F = 156-158° Litt. (11) 155-157,5°

$[\alpha]_D$ = + 46° Litt. (11) + 48°

IR (KBr) 3430, 1676, 1660 cm^{-1}

UV (EtOH) 268 mμ (ε = 10 090)

---

(10) C. DORÉE , J.F. McGHIE et F. KURZER, J.Chem.Soc. (1947) 1467.

(11) E.J. BAILEY, D.H.R.BARTON, J.ELKS et J.F. TEMPLETON, J.Chem.Soc., (1962) 1578.

Transposition benzilique de 9

On ajoute une solution de 26 g de potasse dans 500 ml d'éthanol à une solution de 26 g de dione 9 dans 1,3 l d'éthanol. Après 24 h de reflux sous azote on distille 1,3 l d'éthanol. L'extraction fournit un produit cristallisé (24 g) identifié à l'hydroxy-acide 10. Ce produit est recristallisé dans l'éther de pétrole :

F = 255-258° ; $[\alpha]_D$ = + 55°

IR (KBr) 3540 , 1710 cm^{-1}

Analyse $C_{30}H_{50}O_3$ Calc. % C 78,55 H 10,99
Tr. 78,7 11,1

Oxydation de l'hydroxy-acide 10

L'acide 10 (24 g), dissous dans 1 l de chloroforme et 500 ml d'acide acétique, est traité par 35 g de tétracétate de plomb. Le mélange est agité 24 h à 20°. On ajoute alors 30 ml de diéthylèneglycol et on agite encore 30 mn.

Par extraction et chromatographie on obtient 10 g de A-nor lanosténone 11

F = 120-121,5° ; $[\alpha]_D$ = + 126°

IR (KBr) 1738 cm^{-1}
DC : 307 mμ (+ 4,32)
300 mμ (+ 4,22)

Analyse $C_{29}H_{48}O$ Calc. % C 84,40 H 11,72
Tr. 84,3 11,8

Traitement acide de la A-nor lanosténone

On distille 100 ml d'acide trifluoracétique en le recueillant sur le produit précédent (10 g). Le mélange est ensuite chauffé à reflux sous azote pendant 5 jours. La moitié de l'acide est ensuite distillée et le produit est extrait et chromatographié sur silice.

---

(12) J.F. McGHIE, M.K. PRADHAN et J.F. CAVALLA, J.Chem.Soc. (1952) 3176.

On obtient : - 1 g d'hydrocarbures,
- 3 g de produit de départ,
- 5 g d'une huile incolore : produit A

Une partie du mélange d'hydrocarbures est chromatographiée sur silice. On sépare ainsi deux produits dont le spectre UV indique une faible absorption caractéristique d'un noyau aromatique :

270 mμ (ε = 730) ; 277 mμ (ε = 660)

et 269 mμ , 272 mμ (ε = 970), 277 mμ

Les spectres de RMN de ces produits indiquent qu'il s'agit de mélanges.

Caractérisation et fractionnement de A

Une partie du produit A a été chromatographiée sur alumine puis sur silice avec des quantités croissantes d'adsorbant, sans que les différentes fractions obtenues soient pures sur chromatoplaques bidimensionnelles.

De même des plaques préparatives à élutions multiples ou élution continue de plusieurs jours n'ont fourni que des fractionnements partiels.

La DNPH du mélange A (UV : 391 mμ, ε=44 000) n'a pu être fractionnée dans les mêmes conditions, ni par cristallisation.

Le produit A a les caractéristiques suivantes :

IR ($CHCl_3$) 1695 1610 cm^{-1}

UV (EtOH) 234 mμ (ε=20 000)

RMN : 1 proton vers δ = 5,7

DC : trois fractions différentes de chromatographie présentent les absorptions dichroïques suivantes :

346 mμ (+ 0,6)

332 mμ (+ 1,2)

320 mμ (+ 1,2)

Oxydation de A en diénone B

Le produit A (4 g) est dissous dans 100 ml de diglyme et traité par 4 g de SeO_2. Après 24 h de reflux sous azote l'extraction donne une huile rouge qui est chromatographiée sur alumine.

On obtient ainsi un produit B (1,9 g) aux caractéristiques spectrales homogènes :

IR ($CHCl_3$) 1570 cm^{-1}

UV (EtOH) 285 mμ (ε = 14800)

RMN : 1 proton vers δ = 5,8

Le produit B est hétérogène en chromatoplaque bidimensionnelle et n'a pu être fractionné.

Une partie (100 mg) de B dissoute dans 10 ml de méthanol est traitée 48 h par 200 mg de $NaBH_4$. Après extraction et chromatographie on isole un produit de la polarité d'un alcool. Celui-ci est acétylé et chromatographié sur plaque préparative. L'acétate obtenu (20 mg) est une résine qui a les caractéristiques suivantes :

IR ($CHCl_3$) 1730, 1620, 1250, 980 cm^{-1}

UV ($CHCl_3$) 240, 247 (ε=22000), 256 mμ

Oxydation de B en diènes-diones C

Le produit B (1,8 g) est traité par le mélange suivant : 1,8 g de chromate de sodium , 1,3 g d'acétate de sodium, 12 ml de benzène, 18 ml d'acide acétique et 9 ml d'anhydride acétique. On agite 5 jours sous azote à température ordinaire.

La chromatographie sur alumine de l'huile extraite permet de récupérer 1 g de produit de départ, et 800 mg d'un mélange résineux C.

Une partie de ce dernier est fractionnée par plaques préparatives à élution continue pendant 6 jours.

On sépare ainsi quatre produits :

D 270 mg

E 30 mg

F 40 mg

G 50 mg

dont les caractéristiques spectrales sont données dans le tableau 2.

Traitement acide du lanostène

Du lanostène-8 est préparé par réaction de Wolff-Kishner à partir de la lanostènone $\underline{8}$ selon la méthode de McGhie et al (12).

Le lanostène (1 g) est traité par CF_3CO_2H pur (20 ml) à reflux pendant 24 h avec une bonne agitation et sous azote sec et dépourvu d'oxygène.

Après distillation de 10 ml d'acide, l'extraction fournit une huile chromatographiée sur SiO_2-$AgNO_3$.

La fraction éluée au pentane (300 mg)

- ne s'époxyde pas,
- a un test TNM négatif,
- a une masse moléculaire de 404 ($C_{30}H_{44}$).

Par chromatographie en phase gazeuse (Appareil Profit, colonne Chromosorb W, SE30 1,5 %, 190°) on obtient un massif très large.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION GÉNÉRALE..... 1

PREMIÈRE PARTIE (BIOLOGIQUE)..... 3

- INTRODUCTION
  - Chapitre I : La cyclisation du squalène..... 3
- ÉTUDES CHIMIOTAXONOMIQUES
  - Chapitre II : Séparation et identification des triterpènes tétracycliques monohydroxylés naturels..... 13
  - Chapitre III : Triterpènes de Hura crepitans..... 27
  - Chapitre IV : Répartition des triterpènes dans les latex d'Euphorbia..... 31
- ÉTUDES BIOSYNTHÉTIQUES
  - Chapitre V : Biosynthèse in vitro des triterpènes dans le latex d'Euphorbia..... 43
  - Chapitre VI : Aspects particuliers de la biosynthèse des triterpènes dans les latex d'Euphorbia..... 53
- CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE..... 69

DEUXIÈME PARTIE (CHIMIQUE) 73

- INDICATIONS GÉNÉRALES..... 74
- Chapitre VII : Remarques sur l'époxydation des triterpènes tétracycliques..... 75
- Chapitre VIII : Mécanisme de l'isomérisation de l'euphol..... 87
- Chapitre IX : Essai de transposition dans la série du lanostène-8. 95

Propositions données par la Faculté
ou, éventuellement, seconde thèse :

" SYNTHESES D'AMINO-ACIDES OPTIQUEMENT ACTIFS "

Strasbourg, le 27 novembre 1967
Le Président du Jury,
signé: G. OURISSON

Vu et permis d'imprimer
Strasbourg, le 28 novembre 1967
P. LE DOYEN
l'assesseur,
signé: J. FRENKEL